

**Der Einfluss des Eph/Ephrin-Systems auf die tangentielle  
Migration corticaler und striataler Neurone im basalen  
Telencephalon**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller- Universität Jena

von

Dipl. Biol. Judith Rudolph

geboren am 11.08.1982 in Jena

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürfgen Bolz, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christoph Redies, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Gutachter: Dr. Dominique Bagnard, Université de Strasbourg

Datum der Verteidigung: 02.10.2013

*Curiosity is the essence of the scientific mind.*

Bill Watterson

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Migrationsprozesse während der Entwicklung des Telencephalons .....	1
1.2. Die Lenkung neuronaler Migration.....	4
1.3. Das Eph/Ephrin-System .....	5
1.3.1. Die Eph-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ihre Liganden, die Ephrine .....	5
1.3.2. Eph/Ephrin-Interaktionen .....	7
1.3.3. Clusterung von Ephrinen und Eph-Rezeptoren und Signaltransduktion .....	8
1.3.4. Das Eph/Ephrin-Paradoxon .....	11
1.3.5. Funktionen des Eph/Ephrin-Systems während der Entwicklung .....	12
<b>2. Zielstellung .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
3.1. Versuchstiere .....	18
3.2. Zellbiologische Methoden .....	18
3.2.1. Steriles Arbeiten.....	18
3.2.2. Neuronale Einzelzellen auf verschiedenen Substraten.....	18
Verwendete Substratproteine.....	18
Beschichtung von Deckgläsern mit verschiedenen Substraten .....	18
Präparation dissoziierter neuronaler Einzelzellen .....	20
Stimulation neuronaler Einzelzellen mit rekombinanten Proteinen.....	20
Behandlung mit Inhibitoren oder Aktivatoren .....	21
Nachweis der Abnahme des pFAK-Levels nach Behandlung mit FAK-Inhibitor 14 .....	21
Transfektion neuronaler Einzelzellen mit siRNA .....	21
Nachweis der Herunterregulation von EphA4 und Ephrin-B3 nach Transfektion mit siRNA .....	22
3.2.3. Kultivierung neuronaler Explantate im Plasmaclot .....	23
3.2.4. Darstellung migrierender Neurone in coronalen Schnitten .....	23
Homotypische Transplantation EGFP-exprimierender Explantate .....	23
Markierung migrierender Neurone mit Cell Tracker .....	24
Zugabe rekombinanter Proteine .....	24
3.2.5. <i>in situ</i> -Hybridisierung an Kryostatschnitten .....	25
3.3. Immunfluoreszenzfärbungen.....	26
3.3.1. Immunhistochemie .....	26
3.3.2. Immunzytochemie .....	26
3.4. Mikroskopie .....	27
3.4.1. Fluoreszenzmikroskopie .....	27

3.4.2. Laser-Scanning-Mikroskopie.....	27
3.5. Analyse der Experimente.....	28
3.5.1. Statistik .....	28
3.5.2. Auswertung der Streifenassays .....	28
3.5.3. Bestimmung des pSrc-Levels von Neuronen im Streifenassay .....	28
3.5.4. Auswertung der Explantatkulturen im Plasmacot .....	28
3.5.5. Quantifizierung der Migration von Neuronen in coronalen Schnitten.....	29
Analyse der Migration in <i>in vitro</i> -Kulturen.....	29
Analyse der Migrationsströme an <i>in vivo</i> -Schnitten.....	30
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
4.1. Komplementäre Expression von Ephrinen und Eph-Rezeptoren im basalen Telencephalon .....	31
4.2. Invasion des Striatums nach Blockieren von Ephrin-Liganden.....	32
4.2.1. Darstellung und Quantifizierung migrierender Neurone <i>in vitro</i> .....	32
4.2.2. Blockieren von Ephrin-Liganden .....	34
4.3. Das Striatum wirkt repulsiv auf migrierende corticale Interneurone .....	35
4.3.1. Wirksames EphB1 <i>reverse signaling</i> über Ephrin-B-Liganden.....	35
4.3.2. Die im Striatum exprimierten Faktoren Ephrin-A3 und EphB1 wirken repulsiv auf corticale Interneurone .....	36
4.3.3. Der repulsive Effekt von Ephrin-A3 und EphB1 wird über EphA4 und Ephrin-B3 vermittelt .....	37
4.4. Die Segregation in den dorsalen und ventralen Migrationsstrom erfolgt über bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-signaling.....	40
4.5. Striatale Neurone werden in ihrem Zielgebiet durch EphB1 gestoppt .....	43
4.5.1. Corticale und striatale Interneurone stellen zwei distinkte Populationen tangential migrierender Zellen dar .....	43
4.5.2. EphB1 wirkt für striatale Neurone als Stopp-Signal.....	46
4.5.3. Die Wirkung von EphB1 wird über Src-Kinasen vermittelt .....	50
4.5.4. Neben Src ist auch FAK in das <i>downstream-signaling</i> der B-Liganden involviert .....	51
4.5.5. EphB1 stoppt striatale Neurone durch Reduktion ihres endogenen pSrc-Levels .....	54
Src und FAK bilden einen Signalkomplex .....	54
Einsatz von Src-Inhibitor PP2 im Migrationsassay.....	56
Einsatz eines Src-Aktivators im EphB1-Fc-Streifenassay .....	58
4.6. Migrationsdefekte striataler und corticaler Interneurone in Ephrin-B3-knockout-Mäusen.....	58
4.6.1. Ektopische corticale Interneurone im Striatum von Ephrin-B3-knockout-Mäusen .....	59
4.6.2. Fehlgeleitete striatale Neurone in Ephrin-B3-knockout-Mäusen .....	60

<b>5. Diskussion.....</b>	<b>64</b>
5.1. <i>Lhx6-positive corticale Interneurone im ventralen Migrationsstrom?</i> .....	65
5.2. <i>Die vielfältigen Funktionen des Eph/Ephrin-Systems während der Migration corticaler Interneurone</i> .....	67
5.3. <i>Stopp-Faktoren beenden die neuronale Migration</i> .....	68
5.4. <i>Die Wirkung von EphB1 auf migrierende Neurone wird über FAK/Src-signaling vermittelt</i> .....	70
5.4.1. <i>Die Rolle von FAK und Src bei Zell-ECM-Interaktionen und Migration</i> .....	71
5.4.2. <i>Der lenkende Einfluss von FAK und Src auf migratorische Prozesse</i> .....	75
5.5. <i>Redundanz von Lenkungsfaktoren oder Zelltyp-Spezifität?</i> .....	77
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>83</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>99</b>
9.1. <i>Puffer und Lösungen</i> .....	99
9.1.1. <i>Puffer</i> .....	99
9.1.2. <i>Lösungen für die Zell- und Gewebekultur</i> .....	100
9.1.3. <i>Lösungen für die Immunhistochemie</i> .....	101
9.1.4. <i>sonstige Lösungen</i> .....	102
9.2. <i>weitere Materialien</i> .....	103
9.2.1. <i>rekombinante Proteine</i> .....	103
9.2.2. <i>Antikörper</i> .....	103
9.2.3. <i>siRNAs</i> .....	104
9.2.4. <i>RNA-Sonden</i> .....	104
9.2.5. <i>Primer</i> .....	104
9.2.6. <i>Chemikalien</i> .....	105
9.2.7. <i>Geräte</i> .....	107
9.2.8. <i>weitere Verbrauchsmaterialien</i> .....	107
9.3. <i>Zusatzmaterial</i> .....	107
9.4. <i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	108
9.5. <i>Danksagung</i> .....	109
9.6. <i>Lebenslauf</i> .....	110
9.7. <i>Publikationsliste</i> .....	111
9.8. <i>Eidesstattliche Erklärung</i> .....	113

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 1: Schematischer Aufbau von Ephrinen und Eph-Rezeptoren. ....	6
Abb. 2: Strukturelle Klassen von Ephrinen und Eph-Rezeptoren und ihre Bindungspräferenzen.....	7
Abb. 3: Schematische Darstellung möglicher Signaltransduktionswege im Eph-forward und Ephrin-B-reverse signaling. ....	11
Abb. 4: Schematische Darstellung der Schnittführung an einem coronalen Hirnschnitt.....	20
Abb. 5: Darstellung migrierender Neurone in Gehirnschnitten.....	25
Abb. 6: Analyse von in vitro Experimenten.....	29
Abb. 7: Komplementäre Expressionsmuster im basalen Telencephalon.. ....	32
Abb. 8: Invasion des Striatums nach Blockieren von Ephrin-Liganden in organotypischen Schnittkulturen. ....	35
Abb. 9: Stimulation von MGE-Neuronen mit rekombinantem EphB1-Fc.....	36
Abb. 10: Ephrin-A3 und EphB1 haben einen repulsiven Effekt auf corticale Interneurone. ....	37
Abb. 11: Die Herunterregulation von EphA4 verringert die Repulsion von corticalen Interneuronen durch Ephrin-A3.....	38
Abb. 12: Der repulsive Effekt von EphB1 wird über Ephrin-B3-reverse signaling vermittelt. ....	39
Abb. 13: Das Striatum wirkt repulsiv auf migrierende corticale Interneurone. ....	40
Abb. 14: Ephrin-B3 wirkt repulsiv auf Neurone des dorsalen Migrationsstromes und EphA4 repulsiv auf Neurone des ventralen Migrationsstromes.....	41
Abb. 15: Die repulsive Wirkung von Ephrin-B3 auf Neurone des dorsalen Migrationsstromes und von EphA4 auf Neurone des ventralen Migrationsstromes wird durch bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-signaling vermittelt..	42
Abb. 16: Die Segregation in den dorsalen und ventralen Migrationsstrom sowie die Vermeidung des Striatums werden über EphA4 und Ephrin-B3 vermittelt.....	43
Abb. 17: Immunfärbung striataler und corticaler Interneurone in Kryostatschnitten des basalen Telencephalons	45
Abb. 18: Migrationswege striataler und corticaler Interneurone im basalen Telencephalon. ....	46
Abb. 19: EphB1 wirkt für striatale Neurone als Stopp-Signal.....	48
Abb. 20: Migrationswege striataler und corticaler Interneurone im basalen Telencephalon. ....	49
Abb. 21: Die Verteilung Isl-1-negativer und –positiver Neurone auf EphB1-Fc-Streifen ist Src-abhängig. ....	51
Abb. 22: Orthogonale Ansicht der Kolo-kalisation von EphB1-Bindestellen und pSrc oder pFAK .....	52
Abb. 23: Etablierung des Einsatzes von FAK-Inhibitor 14.....	53
Abb. 24: Die Verteilung Isl-1-negativer und –positiver Neurone auf EphB1-Fc-Streifen ist sowohl abhängig von Src als auch von FAK.....	53
Abb. 25: Kolo-kalisationsstudie von fluoreszenzgekoppeltem EphB1-Fc und pSrc oder pFAK an striatalen und corticalen Interneuronen des ventralen Migrationsstroms.....	55
Abb. 26: Verteilung Isl-1-negativer und –positiver Neurone auf EphB1-Streifen unterschiedlicher Konzentration.	56
Abb. 27: Die Blockierung von Src-Kinasen durch PP2 lässt striatale Zellen stoppen. ....	57
Abb. 28: EphB1 stoppt striatale Neurone durch Reduktion ihres endogenen pSrc-Levels.....	58
Abb. 29: Ektopische corticale Interneurone im Striatum von Ephrin-B3-knockout-Mäusen. ....	60
Abb. 30: Fehlgeleitete striatale Neurone in Ephrin-B3-knockout-Mäusen. ....	61

<i>Abb. 31: Tangential migrierende Neurone im basalen Telencephalon.....</i>	<i>63</i>
<i>Abb. 32: Modellhafte Darstellung der Funktion von Ephrin-B-Liganden im Reelin-Signaltransduktionsweg. ....</i>	<i>70</i>
<i>Abb. 33: Schematische Darstellung der molekularen Struktur dynamischer fokaler Adhäsionskontakte .....</i>	<i>72</i>
<i>Abb. 34: Die Src-abhängige Regulation der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts über Cofilin. ....</i>	<i>74</i>

## **Tabellenverzeichnis**

---

<i>Tabelle 1: Verwendete rekombinante Proteine.....</i>	<i>103</i>
<i>Tabelle 2: Verwendete Antikörper .....</i>	<i>103</i>
<i>Tabelle 3: Verwendete siRNAs.....</i>	<i>104</i>
<i>Tabelle 4: Verwendete RNA-Sonden .....</i>	<i>104</i>
<i>Tabelle 5: Verwendete Primer .....</i>	<i>104</i>
<i>Tabelle 6: Verwendete Chemikalien.....</i>	<i>105</i>
<i>Tabelle 7: Verwendete Geräte.....</i>	<i>107</i>
<i>Tabelle 8: Weitere verwendete Verbrauchsmaterialien .....</i>	<i>107</i>



## 1. Einleitung

Das Gehirn als Steuerzentrale des Körpers besteht aus einem an Komplexität und Leistungsfähigkeit kaum zu übertreffenden Netzwerk von Nervenzellen. Dabei müssen etwa  $10^{12}$  Neurone geordnet miteinander in Verbindung treten, wobei jede einzelne Zelle zwischen eintausend und zehntausend Kontakte zu anderen Neuronen knüpft. Für die korrekte Entwicklung einer derartigen Komplexität ist ein hochentwickeltes regulatorisches System Voraussetzung, welches mit dem scheinbar geringen genetischen Informationsgehalt der Zellen, der noch dazu in jeder Zelle gleich ist, auskommen muss. Dazu müssen Entwicklungsvorgänge wie die Bildung neuronaler Vorläuferzellen, die Ausdifferenzierung dieser, die Wegfindung der Neurone (Migration) und das Auswachsen von Axonen (axonale Lenkung) zu einem Bestimmungsort, als auch die Entstehung spezifischer neuronaler Kontakte gesteuert und reguliert werden. Bei der Kontrolle der Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge spielen räumlich und zeitlich begrenzt exprimierte Regulatorproteine (Transkriptionsfaktoren) eine wesentliche Rolle. Sie ermöglichen, dass Gene zur richtigen Zeit und im rechten Ausmaß abgelesen werden. Ihrem intrinsischen Programm folgend, bilden die Neurone axonale und dendritische Fortsätze aus, mit denen sie über eine Vielzahl membranständiger Rezeptoren ihr komplexes Umfeld, bestehend aus anderen Neuronen und Gliazellen, wahrnehmen und auf dieses reagieren können. Dabei werden migrierende Zellen oder ihre Axone von sogenannten Lenkungsmolekülen zu ihren mitunter weit entfernten Zielgebieten geleitet.

Die korrekte Funktion der Großhirnrinde erfordert ein balanciertes Netzwerk exzitatorischer und inhibitorischer Stimuli. Obwohl corticale Interneurone nur etwa 20 % der neuronalen Gesamtzellpopulation des adulten Neocortex ausmachen, sind sie essentiell für höhere Hirnfunktionen (Druga, 2009). Ihr Neurotransmitter  $\gamma$ -Amino-Butter-Säure (GABA) wirkt postnatal inhibitorisch. Daher filtern sie den Input und regulieren und synchronisieren den Output der exzitatorischen glutamatergen Projektionsneurone und spielen damit eine große Rolle bei der Modulation der corticalen Antwortstärke, sowie bei der Plastizität (Whittington and Traub, 2003, Wang et al., 2004) und der ständigen Umformung neuronaler Verschaltungen (Klausberger and Somogyi, 2008). Sie sind auch an verschiedenen Entwicklungsprozessen beteiligt, wie der Regulation neuronaler Proliferation und Migration während der Entstehung des Neocortex und der Ausbildung corticaler Schaltkreise (Owens and Kriegstein, 2002, Hensch and Fagioli, 2005). Eine Störung dieser feinen Balance zwischen Exzitation und Inhibition führt zur Instabilität der Verschaltungen und kann daher geistige Erkrankungen wie Schizophrenie, Epilepsie und Autismus zur Folge haben (Rubenstein and Merzenich, 2003, Dani et al., 2005, Levitt, 2005, Lewis et al., 2005, Marin, 2012).

### 1.1. Migrationsprozesse während der Entwicklung des Telencephalons

Exzitatorische Projektionsneurone werden in den Proliferationszonen des dorsalen Telencephalons geboren und migrieren radial entlang von Gliazellen, wodurch die typische Schichtung des Neocortex entsteht (Rakic, 1995, Malatesta et al., 2000, Nadarajah et al., 2001). Inhibitorische Interneurone werden dagegen im basalen Telencephalon in der medialen und caudalen ganglionischen Eminenz

(MGE und CGE), sowie im präoptischen Areal (POA) geboren. Anschließend wandern sie tangential auf verschiedenen Migrationswegen in den sich entwickelnden Cortex ein (de Carlos et al., 1996, Tamamaki et al., 1997, Marin and Rubenstein, 2001, Nakajima, 2007, Gelman et al., 2009, Marin et al., 2010, Gelman et al., 2011).

Radial auswandernde corticale Neurone weisen zwei verschiedene Migrationsmodi auf, die Soma-Translokation und die Zell-Lokomotion (Rakic, 1971, 1974, Book and Morest, 1990, Mission et al., 1991, Nadarajah et al., 2001). Die erste Kohorte exzitatorischer Projektionsneurone, die in der VZ geboren wird, wandert während früher Stadien der Cortexentwicklung aus und bildet in der Maus um Embryonaltag 10 (E10) die Präplatte. Während dieser Entwicklungsstadien wandern die Neurone indem sie zunächst einen *leading*-Fortsatz in Migrationsrichtung aussenden und dann den Zellkörper samt Zellkern nachziehen (Nukleokinese). Dabei verkürzt sich der *leading*-Fortsatz, was zur Netto-Bewegung der Zelle führt. Dieser Vorgang wird als Translokation bezeichnet (Allendoerfer and Shatz, 1994, Miyata et al., 2001, Nadarajah et al., 2001, Marin et al., 2010). Die darauffolgenden migratorischen Wellen zur späteren Neurogenese bilden dann die corticale Platte, welche die Präplatte in die superfizielle Marginalzone (MZ) und die tiefer gelegene Subplatte aufspaltet. Dabei wandern die Neurone nach dem oben beschriebenen basalen Migrationsmuster, jedoch entlang von Fortsätzen radialer Gliazellen, die den Neuronen als Gerüst dienen. Diese Form der Migration entwickelte sich wahrscheinlich in Verbindung mit dem "*inside-out*"-Muster der Corticogenese, um später generierte Zellen über komplexere Pfade leiten zu können und wird als Zell-Lokomotion bezeichnet (Rakic, 1972, Nadarajah and Parnavelas, 2002). Somit bestehen die MZ (spätere Schicht I) und die Subplatte aus den am frühesten geborenen Neuronen. Die daraufhin gebildeten Schichten II-VI des Cortex entstehen nach dem "*inside-out*"-Prinzip, wobei Nervenzellen der infragranulären Schichten früh generiert werden, während später geborene Neurone an bereits bestehenden tieferen Schichten vorbei migrieren und die oberen supragranulären corticalen Schichten bilden (Rakic, 1971, 1974, McConnell, 1988, Mission et al., 1991, Nadarajah et al., 2001).

Auch striatale Projektionsneurone wandern radial aus. Sie werden in den ventrikularen Proliferationszonen der LGE geboren und wandern von dort ab E12 radial in das Striatum ein, wie [<sup>3</sup>H]-Thymidin- und Dil-*tracing*-Studien, sowie Transplantationsexperimente gezeigt haben (de Carlos et al., 1996, Olsson et al., 1998). Auch diese Zellen wandern dabei entlang radialer Gliafasern, welche sich ausgehend von der VZ der LGE im rechten Winkel zur Ventrikeloberfläche Richtung Striatum erstrecken (Halliday and Cepko, 1992, Kakita and Goldman, 1999, Hamasaki et al., 2003). Anders als im Cortex scheint diese Glia-geführte Migration jedoch unabhängig vom Reelin-Signalweg zu sein, da in *reeler*-Mäusen, denen das Reelin-Protein fehlt, keine strukturellen Veränderungen im Striatum gefunden wurden (Schiffmann et al., 1997, Lambert de Rouvroit and Goffinet, 1998).

Neben der radialen Migration der Projektionsneurone zeigen GABAerge Interneurone des Subpalliums parallel zu diesen Prozessen eine weitere Migrationsform, die tangentielle Wanderung in den Cortex, den Hippocampus, das Striatum und den olfaktorischen Bulbus (de Carlos et al., 1996, Anderson et al., 1997, Tamamaki et al., 1997, Lavdas et al., 1999, Wichterle et al., 1999, Marin et al., 2000, Wichterle et al., 2001). Der Höhepunkt der Interneuronen-Migration im basalen Telencephalon

liegt während der Embryonalaltage E12,5-14,5. Die meisten Interneurone entstehen dabei in der MGE und der POA und wandern auf distinkten Routen tangential in den Cortex oder das Striatum ein (Anderson et al., 1997, Lavdas et al., 1999, Sussel et al., 1999, Wichterle et al., 1999, Marin et al., 2000, Anderson et al., 2001, Marin and Rubenstein, 2001, Marin et al., 2001, Olivier et al., 2001, Wichterle et al., 2001, Metin et al., 2006, Gelman et al., 2009, Corbin and Butt, 2011, Gelman et al., 2011). Dabei wandern corticale Interneurone aus der MGE dorsal des sich entwickelnden Striatums Richtung Cortex und betreten diesen hauptsächlich über den Migrationsstrom in der Intermediärzone (IZ) (Lavdas et al., 1999, Anderson et al., 2001, Marin and Rubenstein, 2001). Corticale Interneurone aus der POA migrieren dagegen superfiziell ventral des Striatums und wandern vor allem in der Marginalzone in den Cortex ein (Hernandez-Miranda et al., 2010, Zimmer et al., 2011). Anschließend wandern die Zellen radial zu ihrer letztendlichen Position innerhalb der richtigen corticalen Schicht (Polleux et al., 2002, Ang et al., 2003, Tanaka et al., 2003, Hevner et al., 2004). Striatale Interneurone entstehen zur gleichen Zeit ebenfalls in der MGE und der POA und wandern tangential in die striatale Anlage ein (Sussel et al., 1999, Marin et al., 2000, Marin and Rubenstein, 2001, Pauly et al., 2012). Weiterhin konnten Studien von Nery et al. (2002) zeigen, dass die caudale ganglionische Eminenz (CGE) eine zusätzliche Quelle für tangential migrierende Interneurone des Cortex und des Hippocampus darstellt. Die LGE trägt dagegen eher zu Zellpopulationen bei, die in den olfaktorischen Bulbus einwandern (Anderson et al., 2001, Wichterle et al., 2001).

Darüber hinaus ergaben *fate-mapping*-Studien, dass die verschiedenen Subtypen von GABAergen-Interneuronen in verschiedenen Domänen des basalen Telencephalons entstehen. So werden Interneurone, die das Neuropeptid Somatostatin (SST) oder das Kalzium-bindende Protein Parvalbumin (PV) exprimieren, hauptsächlich in der MGE geboren (Wichterle et al., 2001, Xu et al., 2004, Butt et al., 2005, Wonders and Anderson, 2006, Fogarty et al., 2007, Miyoshi et al., 2007, Batista-Brito and Fishell, 2009, Gelman and Marin, 2010, Rubin et al., 2010). In der CGE werden dagegen Interneurone gebildet, welche positiv für das Kalzium-bindende Protein Calretinin (CR), den Serotonin-Rezeptor 3A (5-HTR<sub>3A</sub>), Reelin und/oder *vasoactive intestinal peptide* (VIP) sind (Lopez-Bendito et al., 2004, Gelman and Marin, 2010, Lee et al., 2010, Miyoshi et al., 2010, Vucurovic et al., 2010). Neuropeptid Y (NPY)-positive Interneurone stammen dagegen vor allem aus der CGE und der POA (Gelman et al., 2009, Gelman and Marin, 2010). Dabei exprimieren allerdings die wenigsten GABAergen Interneurone nur einen Marker. Viele sind gekennzeichnet durch eine Kombination verschiedener Faktoren. So sind Interneurone aus der MGE z.B. entweder positiv für PV oder SST, wobei letzteres sowohl allein, als auch in Kombination mit CR und/oder Reelin vorliegen kann (Gelman and Marin, 2010, Miyoshi et al., 2010).

Die tangentielle Migration entspricht dem Typ der Zellkern-Translokation und ist somit unabhängig von leitenden Gliafasern. Dabei wird der Zellkern relativ schnell in den *leading*-Fortsatz nachgezogen, wodurch ein saltatorisches Migrationsmuster entsteht (Marin et al., 2010). Zudem verzweigt sich der *leading*-Fortsatz an der Vorderseite corticaler Interneurone als Teil des migratorischen Zyklus. Der Nukleus wird dann in den stärker ausgebildeten Hauptfortsatz gezogen, während der andere als *trailing*-Fortsatz wieder eingezogen wird. Durch diesen Prozess wird Chemotaxis vermittelt und die Richtung der Migration bestimmt, da neue *leading*-Fortsätze in Richtung eines Chemoattraktants

ausgebildet und stabilisiert werden, bzw. von einem Chemorepellent weggerichtet sind (Bellion et al., 2005, Ward et al., 2005, Kappeler et al., 2006, Martini et al., 2009). Dabei orientieren die Interneurone nicht bestehende Fortsätze um, sondern bilden fortwährend neue Fortsätze aus, wodurch die Migrationsrichtung schneller geändert werden kann (Martini et al., 2009, Marin et al., 2010).

## 1.2. Die Lenkung neuronaler Migration

Die räumlich und zeitlich distinkten migratorischen Ströme tangential migrierender Interneurone müssen gelenkt und reguliert werden, was die Koordination durch verschiedene Signale erforderlich macht. Es ist bereits bekannt, dass motogene und attraktive Faktoren kanalisierend wirken und migrierende Zellen auf ihren entsprechenden Migrationswegen im ventralen Telencephalon halten, während repulsive Faktoren verhindern, dass die Zellen in angrenzende falsche Gebiete eindringen. Zusätzlich sind auch attraktive und permissive Signale im Cortex an der Regulation der Migration GABAerger Interneurone beteiligt (Marin and Rubenstein, 2003).

Schon früh wurde gefunden, dass die diffusiblen Slit-Proteine, welche im Septum (Nguyen Ba-Charvet et al., 1999), sowie in der POA und der VZ der ganglionischen Eminenzen exprimiert werden (Yuan et al., 1999, Marillat et al., 2002, Andrews et al., 2007), die Nicht-Zielregionen POA und Septum unpassierbar für MGE-Interneurone machen (Zhu et al., 1999, Wichterle et al., 2003), bzw. an der Repulsion der Interneurone aus den proliferativen Zonen beteiligt ist (Hu, 1999, Wu et al., 1999, Zhu et al., 1999, Chen et al., 2001). Diese Repulsion wird durch Robo-Rezeptoren auf den corticalen Interneuronen vermittelt, welche daher eine zu Slits komplementäre Expression zeigen (Yuan et al., 1999, Bagri et al., 2002, Marillat et al., 2002, Whitford et al., 2002, Barber et al., 2009). Des Weiteren markieren Klasse-3-Semaphorine das sich entwickelnde Striatum als ein Nicht-Zielgebiet für corticale Interneurone und sind so an der Abgrenzung definierter Routen für tangential migrierende Neurone beteiligt. Corticale Interneurone, die Neuropilin 1 bzw. Neuropilin 2 exprimieren, werden von Semaphorin3A und Semaphorin3F in der striatalen Anlage abgestoßen, während striatale Interneurone, die keine Neuropilin-Rezeptoren exprimieren, in ihr Zielgebiet einwandern können (Marin et al., 2001, Nobrega-Pereira et al., 2008). In diesem Zusammenhang konnten Zimmer et al. (2010) zeigen, dass CSPGs (*chondroitin sulfate carrying proteoglycans*) mit Semaphorin3A koexprimiert sind und die repulsive Wirkung des Sema-Signals auf corticale Interneurone verstärken.

Neben repulsiven Mechanismen konnten auch Moleküle identifiziert werden, welche durch attraktive Interaktionen an der Lenkung und Wegfindung migrierender corticaler Interneurone beteiligt sind oder als motogene Faktoren die Migration der Zellen unterstützen. Dazu zählen die Neureguline, welche an Vertreter der ErbB-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen binden (Buonanno and Fischbach, 2001, Falls, 2003). Zwei Isoformen von Neuregulin-1 (Nrg1), eine sezernierte und eine membrangebundene Form, wirken über kleine bzw. große Distanzen als attraktive Faktoren für Interneurone aus der MGE. Flames et al. (2004) konnten zeigen, dass sezerniertes Nrg1-Ig, welches in den proliferativen Zonen des Cortex exprimiert wird, über weite Entfernungen anziehend auf MGE-Neurone wirkt, woraus eine attraktive Wirkung auf den IZ/SVZ-Migrationsstrom im Cortex abgeleitet wurde. Des Weiteren konnten

sie zeigen, dass membrangebundenes Nrg1-CRD in der SVZ der ganglionischen Eminenzen permissiv für diese Zellen ist, wodurch dieser Faktor die Route dorsal migrierender corticaler Interneurone markiert und an der korrekten Wegfindung der Zellen beteiligt ist (Flames et al., 2004). Der Neuregulin-Rezeptor ErbB4 wird von corticalen Interneuronen aus der MGE exprimiert und kolokalisiert mit dem in der SVZ der ganglionischen Eminenzen exprimierten Interneuronenmarker Dlx2 (Yau et al., 2003). Der Verlust des Neuregulin-1/ErbB4-*signalings* beeinträchtigt die Migration corticaler Interneurone und führt somit zu einer verringerten Anzahl GABAerger Interneurone im Cortex (Flames et al., 2004). Des Weiteren erhöhen verschiedene Wachstumsfaktoren die Motilität tangential migrierender corticaler Interneurone und unterstützen so deren Wanderung. Neurotrophin 4 (NT4) und *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), beides Liganden des Tyrosin-Kinase-Rezeptors TrkB, sowie *hepatocyte growth factor/scatter factor* (HGF/SF) werden als motogene Faktoren beschrieben (Brunstrom et al., 1997). Mäuse, denen die TrkB-Rezeptoren fehlen, zeigen daher ebenfalls weniger corticale Interneurone im Cortex (Polleux et al., 2002). Allerdings ist in diesem Zusammenhang noch nicht ganz geklärt, ob dies an fehlender motogener Unterstützung liegt oder einfach durch eine Reduktion von Zell-Markern zu erklären ist, da z.B. bekannt ist, dass der *knockdown* von BDNF zur Herunterregulation von Calbindin führt (Batista-Brito et al., 2008, Batista-Brito and Fishell, 2009).

### 1.3. Das Eph/Ephrin-System

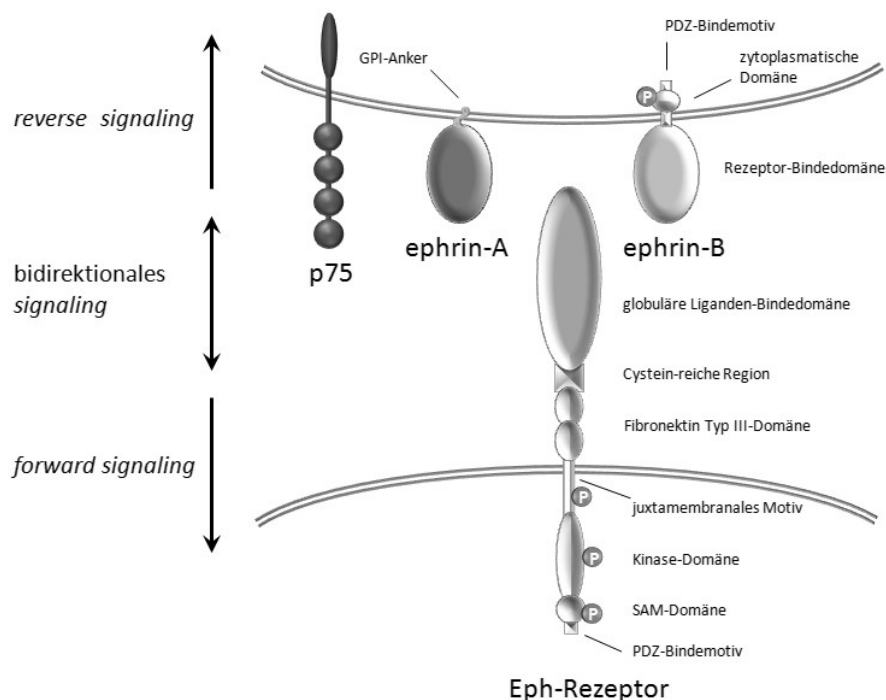
Eine weitere wichtige Gruppe von Lenkungsmolekülen sind die Ephrine und ihre Rezeptoren, die Eph-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Sie stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Ihre membranständigen Vertreter werden räumlich und zeitlich unterschiedlich im sich entwickelnden Gehirn exprimiert (Liebl et al., 2003, Yun et al., 2003, Niehage et al., 2005, Peuckert et al., 2008). Ihnen werden vielfältige Funktionen zugeschrieben. So sind sie an der Regulation der axonalen Lenkung (Drescher, 1997, Flanagan and Vanderhaeghen, 1998, Wilkinson, 2000, Knoll and Drescher, 2002), der Zell-Migration (Santiago and Erickson, 2002, Rudolph et al., 2010, Zimmer et al., 2011) und der Zell-Adhäsion (Holmberg and Frisen, 2002) beteiligt, sowie an anderen Prozessen, die mit der Entwicklung des Nervensystems verbunden sind, wie der Proliferation von Vorläuferzellen, der Zell-Segregation und Segmentierung durch Grenzbildung im Gewebe, sowie Apoptose (Cooke et al., 2005, Solanas et al., 2011, Battle and Wilkinson, 2012, Klein, 2012, Li et al., 2012, Park et al., 2013). Ephrine werden jedoch nicht nur im Nervensystem, sondern in jedem Keimblatt exprimiert. Sie spielen daher beispielsweise auch eine Rolle bei der Entwicklung des Gefäß- und Skelettsystems (Klein, 2012). Diese verschiedenen Einflüsse üben diese Moleküle durch die Induktion von attraktiven oder repulsiven Wechselwirkungen aus, aber auch adhäsive und motogene Effekte wurden bereits beschrieben.

#### 1.3.1. Die Eph-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ihre Liganden, die Ephrine

Die Eph-Rezeptoren stellen die größte bekannte Unterfamilie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen dar und zeichnen sich durch ihre intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität aus. Ihr Name leitet sich von einer Erythropoetin-produzierenden humanen hepatozellulären Karzinoma-Zelllinie ab, aus welcher der

erste Vertreter isoliert wurde (Hirai et al., 1987). Seither wurden 15 verschiedene Eph-Rezeptoren und 9 Eph-Rezeptor interagierende Proteine, oder kurz Ephrine identifiziert. Beide werden entsprechend ihrer Sequenzhomologien und Bindungsaffinitäten in zwei Klassen, A und B, unterteilt (Gale et al., 1996, Eph Nomenclature Committee, 1997, Martinez and Soriano, 2005).

Die extrazelluläre Domäne der Eph-Rezeptoren besteht aus einer hoch konservierten N-terminalen globulären Domäne, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist (Labrador et al., 1997). Dieser schließen sich eine Cystein-reiche Region und zwei Fibronectin Typ III-Domänen an, die einerseits die Rezeptor-Dimerisierung (Lackmann et al., 1998) und andererseits die Interaktion mit anderen Proteinen, wie z. B. NMDA-Rezeptoren vermitteln können (Dalva et al., 2000). Der intrazelluläre Teil des Rezeptors kann in vier funktionelle Teile gegliedert werden. Auf die transmembranale Domäne folgen ein juxtamembranales Motiv, sowie eine Kinase-Domäne, deren Tyrosin-Reste die Auto-phosphorylierung vermitteln. Daran schließt eine SAM (*sterile  $\alpha$ -motif*)-Domäne an, über welche die Rezeptoren zu Dimeren und Oligomeren clustern können. Abschließend ist am carboxyterminalen Ende ein PDZ-Bindemotiv zu finden, über das weitere Proteine gebunden werden können (Abb. 1) (Torres et al., 1998, Kullander and Klein, 2002, Pasquale, 2008). In der inaktiven Konformation des Rezeptors ist die Eph-Kinase-Aktivität durch Interaktion mit der eigenen Juxtamembran-Domäne auto-inhibiert (Wybenga-Groot et al., 2001). Wird der Rezeptor aktiviert, so schwächt die Phosphorylierung der juxtamembranal Tyrosin-Reste die Auto-Inhibition ab, wodurch die Kinase-Domäne in ihre aktive Konformation übergehen und so das *downstream signaling* einleiten kann.

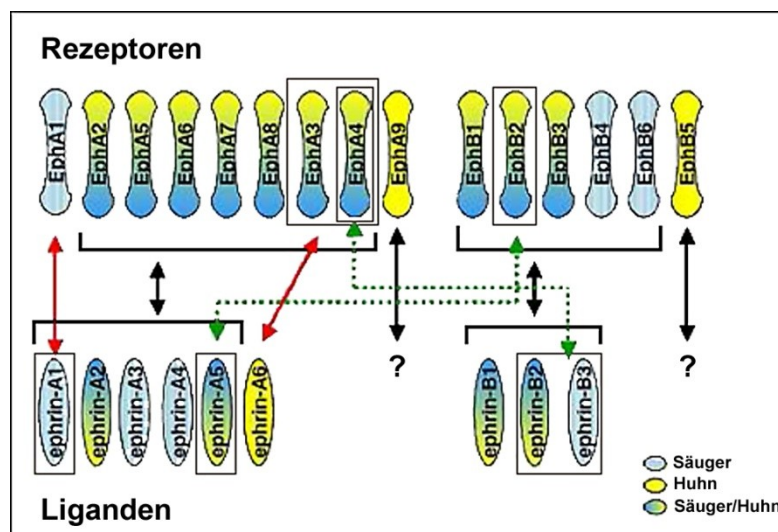


**Abb. 1: Schematischer Aufbau von Ephrinen und Eph-Rezeptoren.** Während die Eph-Rezeptoren beider Klassen einen strukturell ähnlichen Aufbau haben, unterscheiden sich die Ephrine hinsichtlich ihrer Verankerung in der Membran. Ephrin-A-Proteine sind über GPI mit der Zellmembran verbunden, während B-Ephrine transmembranale Proteine mit einer intrazellulären Domäne darstellen. Eph/Ephrin-Interaktionen können klassisch eine Signaltransduktionskaskade in der Eph-Rezeptor-tragenden Zelle austragen (*forward signaling*). Es ist aber auch *reverse signaling* in die Ephrin-Liganden-tragende Zelle möglich, bzw. bidirektionales *signaling* in beide Zellen. *Reverse signaling* wird bei B-Ephrinen über deren intrazelluläre Domäne vermittelt, während A-Ephrine dafür die Unterstützung durch einen transmembranalen Korezeptor wie den Neurotrophin-Rezeptor p75 benötigen. P - mögliche Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. Nach Kullander and Klein, 2002 und Klein, 2009.

Im Gegensatz zu den Rezeptoren unterschieden sich die Liganden der beiden Klassen hinsichtlich ihres Aufbaus. Die Ephrin-Liganden besitzen am N-Terminus eine Rezeptor-Bindedomäne. Diese ist bei A-Ephrinen über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Zellmembran verankert. B-Ephrine besitzen dagegen eine Transmembranregion sowie eine hochkonservierte zytoplasmatische Domäne mit einem PDZ-Bindemotiv am C-terminalen Ende (Abb. 1) (Torres et al., 1998, Song et al., 2002).

### 1.3.2. Eph/Ephrin-Interaktionen

Bindungsstudien haben gezeigt, dass die Ephrine bevorzugt mit den Rezeptoren derselben Klasse interagieren, wobei ein Ligand an mehrere Rezeptoren binden kann (Gale et al., 1996). Diese Bindungen treten jedoch mit unterschiedlichen Affinitäten innerhalb einer Gruppe auf, wodurch Bindungspräferenzen entstehen (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998). So bindet z. B. Ephrin-A5 mit einer deutlich niedrigeren Affinität an EphA3 als an EphA4 oder EphA5 (Monschau et al., 1997). Allerdings wurden auch Einschränkungen, sowie klassenübergreifende Interaktionen beschrieben. So kann EphA1 nur durch die Bindung von Ephrin-A1 aktiviert werden. Andererseits bindet EphA4 klassenübergreifend auch an Ephrin-B2 und -B3 (Gale et al., 1996, Flanagan and Vanderhaeghen, 1998). Des Weiteren ist eine Interaktion zwischen EphB2 und Ephrin-A5 möglich (Himanen et al., 2004). Somit sind die Interaktionen der Eph/Ephrin-Familie noch komplexer als ursprünglich angenommen. Ein Überblick über die bisher bekannten Interaktionsmöglichkeiten ist in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2: Strukturelle Klassen von Ephrinen und Eph-Rezeptoren und ihre Bindungspräferenzen.** Innerhalb einer Klasse binden die meisten Vertreter promiskuitiv untereinander (schwarze Pfeile), es treten jedoch auch einzelne eingeschränkte, bevorzugte Bindungen auf (rote Pfeile). Zusätzlich gibt es bei EphA4 und EphB2 auch klassenübergreifende Interaktionsmöglichkeiten (grüne Pfeile). Für die Rezeptoren EphA9 und EphB5 wurden noch keine passenden Liganden gefunden. Modifiziert nach Martinez and Soriano, 2005.

Eine weitere Besonderheit neben den Bindungsverhältnissen zwischen Liganden und Rezeptoren ist die Richtung, in die die Signalweiterleitung erfolgt. Im Eph/Ephrin-System kann jeder Bindungspartner sowohl als Ligand als auch als Rezeptor wirken. Die Aktivierung der Rezeptoren und die nachfolgende Weiterleitung des Signals in die Rezeptor-tragende Zelle wird als *forward signaling* bezeichnet. Dieses erfordert eine katalytisch aktive Kinase-Domäne des Rezeptors. Ferner kann die Signalweiterleitung jedoch auch in Richtung der Liganden-tragenden Zelle erfolgen. Dieser Vorgang

wird als *reverse signaling* bezeichnet (Abb. 1). Es wurde zuerst für die transmembranalen B-Ephrine beschrieben, welche das Signal mit Hilfe ihrer zytoplasmatischen Domäne in das Zellinnere leiten können. Dabei wird diese Domäne z. B. durch Tyrosin- und Serin-Phosphorylierungen modifiziert, woraufhin weitere Signaleffektoren wie beispielsweise Src-Familie-Kinasen (SFKs) oder Proteine mit PDZ-Domäne rekrutiert werden können (Henkemeyer et al., 1996, Holland et al., 1996, Bruckner et al., 1997, Klein, 2009, Xu and Henkemeyer, 2012). Überraschenderweise zeigte sich, dass auch die Ephrin-A-Liganden, die nur über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden sind und daher keine zytoplasmatische Domäne aufweisen, ein *reverse signaling* auslösen können. Die Signalübertragung erfolgt dabei mit Hilfe eines transmembranalen Korezeptors. Solche Adaptorproteine finden sich beispielsweise in den *lipid rafts*. Dies sind mit Glycosphingolipiden und Cholesterol angereicherten Mikrodomänen der Membran, in denen A-Ephrine Komplexe mit transmembranalen Proteinen bilden und so intrazellulär Signale transduzieren können (Anderson, 1998, Simon, 2000).

### 1.3.3. Clusterung von Ephrinen und Eph-Rezeptoren und Signaltransduktion

Die Aktivierung der Eph-Rezeptoren erfordert die Clusterung der Rezeptor-Liganden-Komplexe zu Oligomeren. Diese müssen dabei membrangebunden vorliegen. Lösliche rekombinante Ephrin-Fc-Fusionsproteine müssen über ihren Fc-Teil artifiziell zu Aggregaten geclustert werden. Monomere Liganden oder ungeclusterte lösliche Ephrine wirken als Antagonisten, da sie die Eph-Rezeptoren nicht aktivieren können und somit keine Signaltransduktion initialisieren (Davis et al., 1994, Lackmann et al., 1998, Gerlai et al., 1999, Carter et al., 2002, Lawrenson et al., 2002, Dobrzanski et al., 2004). Eine Bindung dimerer Liganden führt dagegen zur Rezeptor-Dimerisierung. Dadurch kommt es über niedrig-affine Bindungen zur Ausbildung von Eph-Ephrin-Heterotetrameren bestehend aus jeweils zwei Liganden und Rezeptoren (Himanen et al., 2001, Pasquale, 2005). Zudem können sich durch das Anlagern weiterer Liganden-Rezeptor-Paare größere Multimere ausbilden. So kann beispielsweise die Antwortstärke reguliert werden, wie es für Ephrin-B1 *in vitro* gezeigt werden konnte. Funktionales *forward* und *reverse signaling* erfordert die Aggregation zu größeren Signalkomplexen, wobei auch Ephrin-unabhängig weitere Eph-Rezeptoren durch laterale Rekrutierung über direkte Eph-Eph-Interaktionen in das bestehende Rezeptor-Liganden-Cluster mit aufgenommen werden können (Stein et al., 1998, Wimmer-Kleikamp et al., 2004, Klein, 2012).

Unabhängig von der Größe der später ausgebildeten Rezeptor-Liganden-Komplexe erfolgt die Aktivierung eines Eph-Rezeptors nach folgendem Grundprinzip: Die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor führt zur oben beschriebenen Rezeptor-Dimerisierung. Dabei kommt es zur Konformationsänderung der globulären Domäne der Rezeptoren, wodurch sich die intrazellulären Domänen annähern. Durch diese Vorgänge wird die Trans-Autophosphorylierung der Kinase-Domänen eingeleitet, was zur Aktivierung des Rezeptors führt. Auch an B-Liganden kommt es durch assoziierte Src-Familie-Kinasen zur Tyrosin-Phosphorylierung. Infolgedessen werden an den so aktivierten Liganden und Rezeptoren weitere Bindungsstellen für intrazelluläre Proteine geschaffen, die an der Signaltransduktionskaskade beteiligt sind (Pawson and Bernstein, 1990, van der Geer et al., 1994, Lackmann et al., 1997, Himanen et al., 2001, Weinl et al., 2003, Pasquale, 2005).



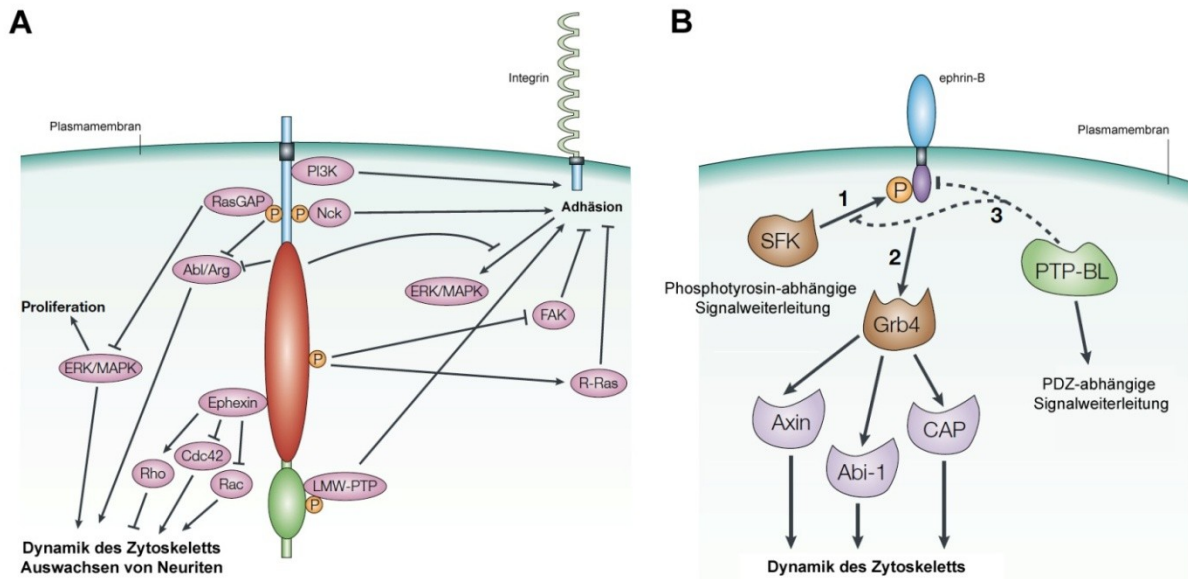
Alle Eph/Ephrin-vermittelten Signalwege zielen direkt oder indirekt auf die Dynamik des Zytoskeletts der Zelle, wodurch deren Form verändert, Adhäsionskontakte reguliert oder Wachstumskegel beeinflusst werden können. Dadurch ergeben sich Auswirkungen auf die Zellmigration, Adhäsion oder axonale Lenkung. Dabei ist ein grundlegender Aspekt des Eph/Ephrin-*signalings*, dass die generierten Signale abhängig vom zellulären Kontext attraktiv oder repulsiv sein können. Dies wird reguliert durch molekulare Schalter wie Neurotrophine, intrazelluläre Kinasen, cAMP oder auch Expressionslevel von Ephrinen und Eph-Rezeptoren selbst, welche die letztendliche Wirkung bestimmen (Hansen et al., 2004, Rodger et al., 2005, Nicol et al., 2006, Nicol et al., 2007, Zimmer et al., 2007, Fitzgerald et al., 2008, Marler et al., 2008). Dabei unterscheiden sich die diversen Mechanismen vor allem hinsichtlich des zeitlichen Aspekts, mit dem sie den *switch* zwischen Attraktion und Repulsion generieren können. Einige Mechanismen, wie Phosphorylierungen und Protein-Protein-Interaktionen, haben nur eine geringe Halbwertszeit und erlauben so rasche Wechsel und damit schnelle Reaktionen auf Veränderungen der zellulären Umwelt. Andere Mechanismen, wie Änderungen der Genexpression, benötigen mehr Zeit, haben dafür jedoch einen langfristigeren Einfluss auf die Reaktionen der Zelle, beispielsweise über Veränderungen der Zellstruktur (Rodger et al., 2012).

Zu den nachgeschalteten *downstream* Molekülen gehören unter anderem Signalproteine mit Src-homologe 2 (SH2)-Domänen, welche an die Phosphotyrosin-Motive aktivierter Rezeptoren und Liganden binden. Beispiele hierfür sind die Src-Familie-Kinasen Fyn oder Src, welche an die Juxtemembran-Domäne der Eph-Rezeptoren über deren phosphorylierte Tyrosin-Reste binden (Ellis et al., 1996, Zisch et al., 1998). Als Proteinkinasen phosphorylieren die SFKs zahlreiche andere Signalmoleküle, deren Funktion und/oder Bindungsaffinität sie dadurch modulieren. Dazu gehören Bestandteile der fokalen Adhäsionskomplexe, Adaptorproteine und Transkriptionsfaktoren. Da wichtige Signalmoleküle, wie beispielsweise die *focal adhesion kinase* FAK, Cortactin (Aktivatoren des Arp2/3 Komplexes während der Umlagerung des Aktin-Zytoskeletts), Catenin als Bestandteile von Zell-Adhäsionskontakten, N-WASP (*neural Wiskott Aldrich Syndrome protein*) oder der RhoA-Inhibitor RhoGAP durch Src-Familie-Kinasen aktiviert werden, nehmen diese eine Schlüsselrolle in der intrazellulären Signaltransduktion ein (Brown and Cooper, 1996, Abram and Courtneidge, 2000, Courtneidge, 2003). Sie können auch als molekulare Schalter in die Regulation von Repulsion versus Attraktion involviert sein. Studien von Zimmer et al. (2007) haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass Ephrin-A5 eine repulsive Wirkung auf corticale Neurone *in vitro* hat, welche durch eine Blockierung der SFKs mittels PP2 in Attraktion konvertiert werden konnte.

Eine wichtige Rolle im Eph-*forward signaling* spielen außerdem die GTPasen der Rho-Familie, zu denen die Unterfamilien RhoA, Rac und Cdc42 gehören. Sie regulieren die Organisation und den Umbau des Aktin-Zytoskeletts. Dabei ist Rho an der Ausbildung und Kontraktion von Stressfasern und deren Ankopplung an Integrin-basierte fokale Adhäsionskontakte beteiligt. Rac spielt eine Rolle bei der Ausbildung von Lamellipodien während der Migration, während Cdc42 die Entstehung von Filopodien reguliert. Die Aktivität dieser Rho GTPasen wird durch *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) reguliert, welche die GTPasen aktivieren, und durch *GTPase-activating proteins* (GAPs), welche inhibierend wirken. Einige GEFs, wie beispielsweise ephexin1 (*Eph-interacting exchange*

*protein 1*), können dabei direkt an Eph-Rezeptoren binden, unabhängig von deren Aktivierungszustand. Eph-gebundenes ephexin1 aktiviert in Abwesenheit von Ephrin-Liganden RhoA, Rac1 und Cdc42, wodurch das Auswachsen von Axonen gefördert wird. Durch die Stimulation der Eph-Rezeptoren nach Ephrin-Bindung und deren Clusterung zu Multimeren wird ephexin1 durch SFKs tyrosin-phosphoryliert. In Folge dessen kommt es zur Verschiebung des Aktivierungs-Gleichgewichtes hin zu RhoA und zur Inhibition von Rac und Cdc42 (Abb. 3A), was den Kollaps axonaler Wachstumskegel auslöst (Shamah et al., 2001, Knoll and Drescher, 2004, Sahin et al., 2005, Egea and Klein, 2007). Im Gegensatz dazu bindet die Vav-Familie der RhoGEFs nur an aktivierte, tyrosin-phosphorylierte Eph-Rezeptoren. Aktiviertes Vav2 fördert die Rac1-abhängige Aktin-Polymerisierung und Endozytose von Eph-Ephrin-Komplexen, was den Kollaps axonaler Wachstumskegel zur Folge hat. Vav2/Vav3 Doppel-Knockouts zeigen daher Defekte in der Lenkung topographischer Axonprojektionen (Cowan et al., 2005).

Verglichen mit dem Eph-*forward signaling* ist noch relativ wenig über die Signalwege des Ephrin-*reverse signalings* bekannt. Typischerweise wird bei B-Liganden die intrazelluläre Domäne tyrosin-phosphoryliert, woraufhin Proteine mit PDZ-Bindemotiv oder SH2-Domäne rekrutiert werden können (Xu and Henkemeyer, 2012). Einen Vertreter der letztgenannten Gruppe stellt Grb4 dar, welches Signalwege einleitet, die das Aktin-Zytoskelett der Zelle und deren Fokalkontakte regulieren (Abb. 3B) (Cowan and Henkemeyer, 2001). Die Bindung von Grb4 ist dabei abhängig von der Phosphorylierung der B-Liganden. Darüber hinaus kann die Protein-Tyrosin-Phosphatase PTP-BL an die PDZ-Domäne der B-Ephrine binden und deren zytoplasmatische Region dephosphorylieren. Dadurch wird das *signaling* unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung und in eine PDZ-abhängige Signalweiterleitung konvertiert, wie es in Abb. 3B dargestellt ist (Kullander and Klein, 2002). Mutationen der PDZ-Domäne unterbinden das Ephrin-B-*reverse signaling* und können dadurch schwerwiegende Folgen haben. So wurden in diesem Zusammenhang Fehlbildungen des Corpus callosum gefunden (Bush and Soriano, 2009), sowie eine gestörte Bildung von Kapillaren des Blut- und Lymphsystems (Makinen et al., 2005, Sawamiphak et al., 2010). Des Weiteren ist die PDZ-Domäne endothelialer Ephrin-B2-Liganden für die Internalisierung der *vascular endothelial growth factor receptors* VEGFR2 und VEGFR3 notwendig. Andernfalls verbleiben diese in der Zellmembran, wodurch die Signalweiterleitung gestört ist, was zu einer verringerten Ausbildung des Endothels führt (Sawamiphak et al., 2010, Wang et al., 2010). Über die Rekrutierung von Src-Kinasen hat das Ephrin-B-*reverse signaling* auch Einfluss auf den Reelin-Signalweg und damit auf die Migration corticaler Projektionsneurone. Das Fehlen von Ephrin-B-Liganden führte dabei zu Migrationsdefekten ähnlich denen des *reeler*-Phänotyps, bei dem die corticalen Schichten invertiert sind (Sentürk et al., 2011).



**Abb. 3: Schematische Darstellung möglicher Signaltransduktionswege im Eph-forward und Ephrin-B-reverse signaling.** (A) Aktivierte Eph-Rezeptoren können über die Rekrutierung von Adaptorproteinen viele verschiedene Signalwege einleiten. Diese haben größtenteils Einfluss auf die Dynamik des Zytoskeletts oder die Anhaftung der Zelle über Adhäsionskontakte. (B) Die Aktivierung der B-Ephrine führt zur Phosphorylierung der zytosomatischen Domäne durch SFKs (1). Dadurch können SH2-Domänen-Adaptorproteine wie Grb4 rekrutiert werden, die wiederum Signalwege zur Regulation des Aktin-Zytoskeletts initiieren können (2). Zeitverzögert wird die Phosphatase PTP-BL über deren PDZ-Motiv gebunden. Diese dephosphoryliert Ephrin-B und inaktiviert Src, worüber die Phosphotyrosin-unabhängige, PDZ-abhängige Signalweiterleitung eingeleitet wird (3). Abl - Abelson; Arg - Abl-related gene; GAP - GTPase activating protein; PI3K - Phosphatidylinositol 3-Kinase; FAK - focal adhesion kinase; LMW-PTP - low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase; Nck - SH2-SH3 Adaptorprotein. Aus Kullander and Klein, 2002.

Obwohl Ephrin-A-Proteine im Gegensatz zu B-Liganden keine intrazelluläre Domäne besitzen, sind sie mit Hilfe von transmembranalen Korezeptoren ebenfalls in der Lage *reverse signaling* zu vermitteln. Dem Neurotrophin-Rezeptor p75 wird solch eine Rolle während der Ausbildung der Retinotopie (Lim et al., 2008) und als Korezeptor für A-Ephrine an Synapsen zugeschrieben, da p75-defiziente Mäuse Veränderungen der Spines zeigten (Zagrebelsky et al., 2005). Des Weiteren wurde eine Interaktion von A-Ephrinen und dem Ret Tyrosin-Kinase-Rezeptor in Motoraxonen beschrieben (Bonanomi et al., 2012), sowie mit dem Neurotrophin-Rezeptor TrkB (Marler et al., 2008). Außerdem zeigte sich, dass Fyn, ein Vertreter der SFKs, mit Ephrin-A-Liganden in den *lipid rafts* kolokalisiert und in das *reverse signaling* involviert ist (Davy et al., 1999).

### 1.3.4. Das Eph/Ephrin-Paradoxon

Da sowohl Eph-Rezeptoren als auch Ephrin-Liganden membrangebunden vorliegen, sind alle Prozesse dieses Systems auf Zell-Zell-Interaktionen beschränkt. Trotz hoch-affiner multimerer Rezeptor-Liganden-Bindung werden jedoch größtenteils repulsive Effekte zwischen den beteiligten Zellen ausgelöst. Somit stellt sich die Frage, welche molekularen Abläufe Eph-Ephrin-vermittelte Adhäsion in Repulsion umwandeln können. Dafür muss die hoch-affine Bindung zwischen Rezeptoren und Liganden gelöst werden. Bisher wurden dazu in der Literatur verschiedene Möglichkeiten diskutiert. Für die GPI-verankerten A-Ephrine wurde ein Mechanismus beschrieben, bei dem die Metalloprotease ADAM10 (*A-Disintegrin-And-Metalloprotease 10*) die Ephrin-A-Ektodomäne abspaltet, wodurch sich die Zellen voneinander lösen können. Dabei kann das Abschneiden in *cis* oder in *trans* erfolgen, je nachdem, ob die Metalloprotease mit den Ephrin-A-Liganden oder den

Rezeptoren koexprimiert wird (Hattori et al., 2000, Egea and Klein, 2007). Darüber hinaus gibt es für das A-System noch einen weiteren Mechanismus, der nach Rezeptor-Liganden-Bindung repulsive Interaktionen ermöglicht. Zimmer et al. (2007) konnten eine als *membrane ripping* bezeichnete Abgabe aktivierter EphA-Rezeptoren an homogenes Ephrin-A5-Fc beobachten. Diese EphA-Rezeptorabgabe konnte auch nach Zell-Zell-Kontakt zwischen corticalen Neuronen und Ephrin-A5-transfizierten Fibroblasten gezeigt werden. Für die transmembranalen B-Ephrine wurde ein alternativer Mechanismus beschrieben, der die Loslösung der Zellen ermöglicht. Es wurde eine bidirektionale *trans*-Endozytose vollständiger Rezeptor-Liganden-Komplexe beobachtet, bei der *full-length*-Proteine in *trans* in die Rezeptor- oder Liganden-tragende Zelle aufgenommen werden. Dieser Vorgang ist abhängig von der Aktivität der Eph-Rezeptor-Kinase (Marston et al., 2003, Zimmer et al., 2003, Egea and Klein, 2007). Dabei hat die Endozytose nicht nur die Funktion, das *signaling* durch das Entfernen der Rezeptor-Liganden-Komplexe zu beenden, vielmehr trägt sie auch aktiv zur Kompartimentierung der Signalwege bei. Sie trägt das Signal von der Oberfläche in das Zellinnere und generiert neue Signale, die an der Plasmamembran nicht zulässig sind (Scita and Di Fiore, 2010, Janes et al., 2012).

### 1.3.5. Funktionen des Eph/Ephrin-Systems während der Entwicklung

Wie die Vielzahl von Signaltransduktionswegen schon vermuten lässt, spielt das Eph/Ephrin-System eine wichtige Rolle während verschiedenster Entwicklungsprozesse. Am besten untersucht ist seine Bedeutung dabei im Nervensystem, obwohl es auch in anderen Geweben vielfältige Funktionen übernimmt. Dabei wird es vor allem als ein System mit repulsiver Wirkung beschrieben (O'Leary and Wilkinson, 1999, Kullander and Klein, 2002, Klein, 2004). Repulsive Eph/Ephrin-Interaktionen verhindern das Einwandern von Zellen oder das Einwachsen von Axonen in Liganden-exprimierende Regionen und sind somit an deren Wegfindung während der Entwicklung beteiligt (Flanagan and Vanderhaeghen, 1998, Vanderhaeghen et al., 2000, Wilkinson, 2000, Uziel et al., 2002).

Das am besten untersuchte Beispiel der Axonlenkung durch repulsive Interaktionen stellt die Entwicklung der topographischen retinotektalen Projektionen dar. Dabei bleiben die räumlichen Beziehungen zwischen benachbarten Neuronen durch die geordnete Projektion der Axone zu ihren Zielen erhalten. Die Axone der retinalen Ganglienzellen (RGC) projizieren zum Tectum opticum bzw. bei *Mammalia* zum Colliculus superior, und entwickeln dabei in diesem Gebiet entlang der anterior-posterior-, sowie der dorsal-ventral-Achse eine topographische Karte der Retina. Dabei projizieren Ganglienzellen der temporalen Retina in das anteriore Tectum, während nasale RGCs zum posterioren Tectum ziehen (Holt and Harris, 1993). Diese Projektion kommt durch die graduelle Expression von A-Ephrinen und EphA-Rezeptoren in beiden Gebieten zustande. Ephrin-A2 und Ephrin-A5 werden in einem ansteigenden Gradienten von anterior nach posterior im Tectum exprimiert, wohingegen die Expression von EphA3 in der Retina komplementär verläuft und von temporal nach nasal abnimmt. Aufgrund repulsiver Eph/Ephrin-Interaktionen projizieren nasale retinale Ganglienzellen mit weniger Rezeptoren in das posteriore Tectum, welches eine hohe Ligandenexpression aufweist. Umgekehrt projizieren temporale retinale Axone mit einer hohen Rezeptordichte in anteriore Bereiche des Tectums mit weniger Liganden (Cheng et al., 1995, Drescher et al., 1995, Feldheim et al., 1998, Flanagan and Vanderhaeghen, 1998, Suetterlin et al.,

2012). Auch in der dorsal-ventral-Achse bleiben die topographischen Beziehungen durch die komplementäre Expression von Ephrinen und Eph-Rezeptoren bestehen, jedoch ist hier EphB/Ephrin-B-signaling involviert. Zudem wirkt dieses hier attraktiv. Die Expression der Rezeptoren EphB2 und EphB3 nimmt in der Retina von dorsal nach ventral zu, wodurch Axone ventral gelegener Ganglienzellen in das dorsale Tectum einwachsen, in dem auch der Ephrin-B1-Gradient sein Maximum erreicht (O'Leary and Wilkinson, 1999, Pasquale, 2005).

Das Eph/Ephrin-System ist auch in topographische Projektionen anderer Regionen des Nervensystems involviert. Repulsive EphA/Ephrin-A-Interaktionen sind an der korrekten Zielfindung thalamocorticaler Axone beteiligt und spielen damit eine Rolle bei der topographischen Projektion im somatosensorischen Cortex. So wird beispielsweise Ephrin-A5 in der corticalen Platte in einem von lateral nach medial ansteigenden Gradienten exprimiert, während EphA4 im Ventrobasal-Complex (VB) des Thalamus dazu komplementär in einem Gradienten von dorsolateral nach ventromedial vorliegt. Da Ephrin-A5 repulsiv auf EphA4-exprimierende thalamische Axone wirkt, projizieren Axone des medialen VB mit der höchsten Rezeptordichte zum lateralen Cortex, wo die Konzentration von Ephrin-A5 nur gering ist (Vanderhaeghen et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass repulsive Ephrin-Wirkungen an der korrekten Verknüpfung von Hirnarealen beteiligt sind. So verhindert die Ephrin-A5-Expression im somatosensorischen Cortex das Einwachsen limbischer EphA5-exprimierender Axone des medialen und anterioren Thalamus, welche zum Cingulum projizieren und für die dieser Teil des Cortex das falsche Zielgebiet darstellt. In Ephrin-A5-knockout-Tieren fehlt diese lenkende repulsive Wirkung auf die limbischen Axone, weshalb diese daher zusätzliche ektopische Projektionen zum somatosensorischen Cortex ausbilden (Gao et al., 1998, Uziel et al., 2002).

Neben diesen repulsiven Wirkungen zeigt das Eph/Ephrin-System jedoch auch eine Reihe attraktiver Effekte. Castellani et al. (1998) beobachteten, dass Ephrin-A5 intracortical die Verzweigung der Axone von Schicht-VI-Neuronen in der Ephrin-A5-exprimierenden Schicht IV des Cortex fördert. Solch eine verzweigungsfördernde Wirkung konnte ebenfalls für hippocampale Neurone festgestellt werden, welche nach Stimulation mit Ephrin-Liganden *in vitro* eine stärkere Verzweigung und eine erhöhte Gesamtlänge zeigten. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von rekombinantem EphA3-Fc gehemmt werden (Gao et al., 1999). Auch bei thalamocorticalen Axonen, die in Schicht IV des somatosensorischen Cortex terminieren, fördert die Ephrin-A5-Expression in dieser Schicht die Ausbildung von Axonkollateralen. *In vitro*-Experimente zeigten in diesem Zusammenhang ein stärkeres Auswachsen thalamischer Axone und eine vermehrte Verzweigung dieser auf Ephrin-A5-exprimierenden Schicht-IV-Membranen (Mann et al., 2002). In Übereinstimmung damit zeigten *in vivo*-Daten, dass in Ephrin-A5-knockout Mäusen die Schichtspezifität der thalamischen Afferenzen erhalten bleibt, jedoch die Anzahl und die Länge vorhandener Kollateralen, sowie die Gesamtlänge aller Verzweigungen in Schicht IV reduziert ist (Mühlfriedel, 1999). Dieser in der Ephrin-A5-Mutante beobachtete verringerte thalamische Input führt bei Schicht-IV-Sternzellen, den Zielzellen dieser thalamocorticalen Projektion, zu morphologischen Veränderungen. Bei Jungtieren (P8) versuchen die Sternzellen vermutlich, den reduzierten thalamischen Input durch erhöhte Filopodienbildung und verstärkte dendritische Verzweigung zu kompensieren. Später im Adultstadium konnten jedoch nicht

genügend stabile Kontakte ausgebildet werden, wodurch die Zellen nun deutlich weniger Spines besitzen, die Verzweigung der Dendriten jedoch erhöht bleibt (Guellmar et al., 2009). Dies lässt darauf schließen, dass Ephrin-A5 auch für die Ausbildung intracorticaler Verschaltungen notwendig ist und die Verzweigung thalamischer Axone in der korrekten corticalen Schicht reguliert.

Angesichts der vielen Funktionen, die das Eph/Ephrin-System während der Entwicklung übernimmt und der Vielzahl an involvierten Signalwege, überrascht es nicht, dass die Rolle dieser Proteine bei der Regulation von Zell-Zell-Interaktionen auch einen Einfluss auf die Zellmobilität hat. Repulsive oder attraktive Eph/Ephrin-Wechselwirkungen sind beispielsweise an der Segregation von Zellpopulationen beteiligt und werden benötigt um scharfe Grenzen in Geweben auszubilden und zu erhalten. Dafür werden Liganden und Rezeptoren komplementär exprimiert – ein Merkmal, das in vielen Geweben während der Entwicklung zu finden ist, beispielsweise während der Entstehung der Rhombomere des Hinterhirns. Die Ausbildung der Segmentgrenzen wird dabei durch zwei Prozesse gesteuert. Zum einen durch das Aussortieren unterschiedlicher Neuronentypen an den Grenzen und zum anderen durch eine dynamische Regulation der Expression segmentspezifischer Faktoren der Neurone innerhalb der einzelnen Segmente. Im Zebrafisch wird die Grenzbildung durch das Zusammenspiel repulsiver und adhäsiver Interaktionen realisiert: repulsive Wechselwirkungen zwischen Ephrin-B- und EphA-exprimierenden Zellen an den Rhombomerkanten schärfen die entstehenden Grenzen. Dies wird durch adhäsive Wirkungen zwischen Zellen der gleichen Kohorte unterstützt (Cooke et al., 2005, Batlle and Wilkinson, 2012). Grenzbildung durch Zell-Segregation kann aber auch auf andere Weise entstehen. In Epithelgeweben von Säugern wurde eine ADAM10-vermittelte Spaltung des Zelladhäsionsproteins E-Cadherin an Eph/Ephrin-Grenzflächen beobachtet, welche durch EphB3-/Ephrin-B1-Interaktionen ausgelöst wird. Dadurch entstehen unterschiedlich starke Adhäsionen, die zur Trennung der Gewebe führen (Solanas et al., 2011).

Das Eph/Ephrin-*signaling* spielt aber auch bei anderen Migrationsprozessen im sich entwickelnden Gehirn eine wichtige Rolle. So wurde es mit der Migration verschiedener neuronaler und nicht-neuronaler Zellen in Verbindung gebracht, wie Motoneuronen, Zellen des Innenohres, Endothelzellen während der Entwicklung des Gefäßsystems, Schwann-Zellen und Oligodendrozyten (Wilby et al., 1999, Prestoz et al., 2004, Drescher, 2011, Saeger et al., 2011, Zhou et al., 2011). Des Weiteren sind EphB-/Ephrin-B-Interaktionen an der Regulation der Proliferation von Neuroblasten in der SVZ des lateralen Ventrikels im adulten Gehirn beteiligt, sowie an deren Lenkung entlang des rostralen Migrationsstroms (RMS) zu ihrem Zielgebiet im Bulbus olfactorius (Katakowski et al., 2005, Ricard et al., 2006). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Expression von B-Ephrinen im posterioren Teil der Somiten während der Embryonalentwicklung das Einwandern EphB2-exprimierender Neuralleistenzellen in diese Region verhindert, wodurch der Migrationsweg dieser Zellen nach ventrolateral gelenkt wird (Santiago and Erickson, 2002). Gut untersucht ist auch der Einfluss des Eph/Ephrin-Systems bei der Lenkung neu gebildeter corticaler Vorläuferzellen und Neurone (Zimmer et al., 2007, Zimmer et al., 2008, Torii et al., 2009, Rudolph et al., 2010, Sentürk et al., 2011). Dabei zeigte sich, dass B-Ephrine in den Reelin-Signalweg involviert sind und so an der Regulation der Reelin-abhängigen radialen Migration corticaler Projektionsneurone beteiligt sind (Sentürk et al., 2011). Die migrierenden Pyramidenzellen bilden dabei radial ausgerichtete Säulen aus, welche auf der Verteilung verwandter

neuronaler Vorläufer eines Klons in der VZ des Cortex basieren (Mountcastle, 1997). Im Zusammenhang mit der tangentialen Migration corticaler Interneurone konnte bereits gezeigt werden, dass Calbindin-exprimierende Interneurone aus der MGE EphA4-Rezeptoren tragen und durch die Ephrin-A5 exprimierenden Zellen der Ventrikularzone der ganglionischen Eminenzen abgestoßen werden. Dadurch bildet die VZ eine repulsive Flanke, welche den dorsalen Migrationsweg markiert und somit zur korrekten Wegfindung migrierender corticaler Interneurone beiträgt (Zimmer et al., 2008). Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass EphA4 über Ephrin-A2-*reverse signaling in vitro* und *in vivo* einen zelltypspezifischen motogenen Effekt auf diese migrierende Interneurone aus der MGE ausübt und somit deren Migration Richtung Cortex fördert (Steinecke, 2013).

## 2. Zielstellung

Das Eph/Ephrin-System ist an einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen beteiligt und übernimmt die unterschiedlichsten Funktionen im Organismus. Es spielt eine wichtige Rolle während verschiedener Entwicklungsvorgänge und ist unter anderem in Migrationsprozesse involviert. Während der embryonalen Gehirnentwicklung wandern corticale und striatale Interneurone von ihren Ursprungsgebieten im basalen Telencephalon zu ihren weit entfernten Zielgebieten. Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden sorgen dabei für eine präzise Lenkung der wandernden Neurone. Obwohl diese tangentielle Migration bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war, bleiben noch immer viele Fragen unbeantwortet. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Migrationswege corticaler und striataler Interneurone aus zwei verschiedenen Ursprungsgebieten im basalen Telencephalon zu charakterisieren und ihre Lenkung durch verschiedene Mitglieder des Eph/Ephrin-Systems näher zu untersuchen.

### 1. Charakterisierung der Migrationswege corticaler Interneurone aus MGE und POA

Ausgehend von Expressionsmustern der Ephrine und Eph-Rezeptoren an E14 sollten relevante Vertreter dieser Proteingruppen ermittelt werden, die einen Einfluss auf die tangentielle Migration corticaler Interneurone haben könnten. Die Beteiligung verschiedener Eph/Ephrin-Interaktionen an der Wegfindung corticaler Interneurone während der Entwicklung sollte anschließend mit Hilfe verschiedener *in vitro*-Assays verifiziert werden. Beispielsweise wurde die Veränderung des Migrationsmusters in organotypischen Schnittkulturen nach Blockierung exprimierter Liganden oder Rezeptoren durch Zugabe rekombinanter Proteine überprüft. Des Weiteren sollte der direkte Einfluss der involvierten Vertreter Ephrin-A3 und EphB1 auf corticale Interneurone im Streifenassay getestet werden, wodurch sich Rückschlüsse auf deren Wirkungsweise ziehen ließen. In diesem Zusammenhang galt es auch zu klären, über welche zellulären Interaktionspartner die Signalkaskade abläuft und inwiefern EphB1 corticale Interneurone aktivieren und in ihnen ein *reverse signaling* auslösen kann.

### 2. Untersuchung des Einflusses von EphB1 auf striatale und corticale Interneurone

Da striatale Interneurone im gleichen Entwicklungsstadium wie corticale Interneurone ebenfalls im basalen Telencephalon geboren werden und tangential in ihr Zielgebiet, das Striatum, einwandern, sollte der Einfluss von EphB1 auf diese Zellpopulation untersucht werden. Dazu war eine immunzytochemische Charakterisierung der Neurone erforderlich, um die zwei Populationen zu unterscheiden. Neben dem Streifenassay kam hier zusätzlich der Migrationsassay zum Einsatz, welcher eine feinere Aussage über die Wirkung von EphB1 zulässt, da auch motogene Effekte sichtbar werden. Ziel dieses Teils der Arbeit war es vor allem, durch die Untersuchung der beteiligten Signalwege die zugrundeliegenden Mechanismen aufzudecken, die zu der differentiellen Wirkung von EphB1 auf corticale und striatale Neurone führen.



### **3. Migrationsdefekte striataler und corticaler Interneurone in Ephrin-B3-knockout Mäusen**

Abschließend sollten die Befunde aus den *in vitro*-Experimenten direkt *in vivo* in Ephrin-B3-knockout-Mäusen getestet werden. Dazu war die Migration corticaler und striataler Interneurone anhand immunhistochemisch gefärbter Hirnschnitte homozygoter Ephrin-B3-knockout-Tiere zu untersuchen und zu prüfen, inwieweit die beobachteten Phänotypen mit den zuvor aufgestellten Hypothesen in Einklang zu bringen sind.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Versuchstiere

Für alle durchgeführten Experimente wurden Mäuse des NOR-Stammes, des Stammes C57 BL/6J, EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)-exprimierende Mäuse (Okabe et al., 1997) oder Ephrin-B3-knockout (Ephrin-B3<sup>-/-</sup>) -Tiere des Stammes C57BL/6J (Kullander et al., 2001) verwendet. Die Zucht erfolgte in einem klimatisierten Raum mit regelmäßigem Hell-Dunkel-Wechsel, Wasser und Futter standen dabei *ad libitum* zur Verfügung. Für die zeitliche Verpaarung wurden die Tiere über Nacht verpaart, wobei der Folgetag als Embryonaltag 1 bezeichnet wurde, darauffolgende Tage dementsprechend als E2-E21.

#### 3.2. Zellbiologische Methoden

##### 3.2.1. Steriles Arbeiten

Alle Arbeitsschritte zur Aufbereitung von Gehirngewebe für *in vitro* Experimente wurden unter sterilen Bedingungen in Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Die verwendeten Puffer, Medien, Petrischalen, Reaktionsgefäße und Pipetten waren keimfrei, ebenso das verwendete Präparierbesteck, welches hierzu für 10 s im Hot-Bead-Sterilisator bei 260 °C behandelt wurde. Die Kultivierung der Zellen, Explantate oder Schnitte erfolgte im Brutschrank in humider Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

##### 3.2.2. Neuronale Einzelzellen auf verschiedenen Substraten

###### Verwendete Substratproteine

Es wurden chimäres, rekombinantes humanes Ephrin-A3-Fc und Ephrin-B3-Fc, sowie murines EphB1-Fc (Ratte) und EphA4-Fc (Maus) verwendet. Als Kontrolle diente die Fc-Region des humanen IgG<sub>1</sub> (Fc-Protein). Diese rekombinanten Proteine bestehen aus der extrazellulären Domäne des humanen Ephrin-A3 (Met1 – Ser209) oder Ephrin-B3 (Met1 – Ser224) bzw. des murinen EphB1 (Met18 – Gln538) oder EphA4 (Val20 – Thr547), welche über einen Polypeptid-Linker mit der Fc-Region des humanen IgG<sub>1</sub> (Pro100 – Lys330) verbunden sind. Dieser Fc-Teil erlaubt das Clustern der rekombinanten Liganden zu größeren Multimeren, wodurch sie die Eph-Rezeptoren aktivieren können. Des Weiteren ist eine Markierung mit fluoreszenzgekoppelten anti-humanen IgG-Antikörpern möglich. Das Protein-Antikörper-Gemisch wurde in PBS gelöst und vor der Verwendung 30 min bei Raumtemperatur (RT) präinkubiert.

###### Beschichtung von Deckgläsern mit verschiedenen Substraten

Um den Zellen ein adhärentes Wachstum auf den Deckgläsern zu ermöglichen, wurden diese homogen mit einer Mischung aus Laminin und Poly-L-Lysin (PLL) in GBSS beschichtet. Dazu wurden 100 µl der Beschichtungslösung auf ein Deckglas (12 x 25 mm; Menzel-Gläser) aufgebracht und ein zweites Deckglas vorsichtig darüber gelegt. Diese Sandwiches wurden für mindestens 30 min im

Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Deckgläser vorsichtig auseinander genommen, in Aqua bidest gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet.

### Anfertigung alternierender Streifen – Monostreifen

Um die Wirkung eines Faktors auf Neurone zu testen, wurden die Zellen auf alternierenden Streifen eines Testsubstrates und eines Kontrollsubstrates kultiviert und anschließend ihre Verteilung auf diesen Streifen analysiert. Als Testsubstrate wurden rekombinantes EphB1-Fc und Ephrin-A3-Fc verwendet, die Kontrollstreifen bestanden aus Laminin und Poly-L-Lysin. Zur Herstellung dieser Streifen (nach Vielmetter et al., 1990) wurden spezielle Silikon-Matrizen verwendet, die vom Max-Planck Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen zur Verfügung gestellt wurden. Die Matrizen haben parallele 50 µm breite Kanäle, die durch 40 µm breite Balken voneinander getrennt sind und durch einen angeschlossenen Injektionskanal mit Hilfe einer Hamilton-Pipette gefüllt werden können.

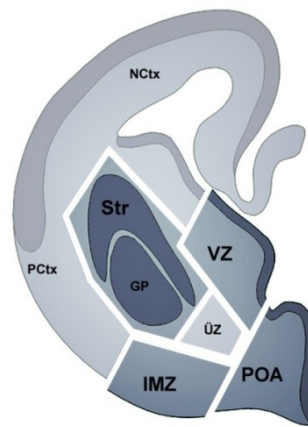
Die Matrizen wurden vor Gebrauch mindestens 10 min in 70 % Ethanol gereinigt, 5 min in Aqua bidest gekocht und unter der Sterilbank getrocknet. Dann wurde ein mit Salpetersäure gereinigtes Deckglas mittig auf das Streifenfeld aufgelegt und 25 µl der Substratlösung injiziert. 10 µg/ml der rekombinanten Proteine wurden dafür zuvor mit 30 µg/ml Alexa488- oder Alexa546-gekoppeltem goat anti-human IgG geclustert. Für stärker konzentrierte Streifen wurden 50 µg/ml Protein mit 50 µg/ml Alexa488- oder Alexa546-markiertem goat anti-human IgG geclustert. Nach 40 min Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C wurden die Kanäle mit 150 µl PBS gespült und das Deckglas vorsichtig abgenommen. Nach diesem Schritt konnten die Streifenfelder falls erforderlich bei 4 °C in PBS bis zum nächsten Tag aufbewahrt werden. Anschließend wurden sie mit 150 µl Laminin-PLL-Gemisch überschichtet und bis zum Aufbringen der Zellen im Brutschrank inkubiert.

### Anfertigung alternierender Streifen – Doppelstreifen

Um die Präferenz der Neurone für einen bestimmten Lenkungsfaktor zu bestimmen, wurden Doppelstreifen angefertigt, bei denen den Zellen zwei verschiedene Testsubstrate angeboten wurden. In diesem Falle gab es also keine Kontrollstreifen, sondern es stand die Wahl zwischen alternierenden Ephrin-B3-Fc- und EphA4-Fc-Streifen. Um Doppelstreifen zu erhalten, wurden die Stege der Silikon-Matrizen mit 2 µg/ml Ephrin-B3-Fc oder EphA4-Fc, geclustert mit 30 µg/ml Alexa-markiertem goat anti-human IgG, für 30 min im Brutschrank bei 37 °C beschichtet. Danach wurde die Lösung entfernt und die auf den Silikonstegen haftenden Proteine auf ein mit Salpetersäure gereinigtes Deckglas gestempelt. Anschließend wurden sofort die Kanäle der Matrize mit der Injektionslösung gefüllt. Diese enthielt 20 µg/ml Ephrin-B3-Fc oder EphA4-Fc, geclustert mit 30 µg/ml Alexa-markiertem goat anti-human IgG. Nach 40 min Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C wurden die Kanäle mit 150 µl PBS gespült, das Deckglas vorsichtig abgenommen und das Streifenfeld mit 150 µl Laminin-PLL-Gemisch überschichtet. Als interne Kontrolle wurden sowohl Streifenfelder mit gestempeltem Ephrin-B3-Fc und injiziertem EphA4-Fc gefertigt, als auch umgekehrt. Dabei wurden die Streifen unterschiedlich farbig mit Alexa488- oder Alexa546 goat anti-human IgG fluoreszenzmarkiert. Die Doppelstreifenexperimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Geraldine Zimmer durchgeführt.

### Präparation dissoziierter neuronaler Einzelzellen

Zur Gewinnung neuronaler Einzelzellen wurden Mäuse des Embryonalaltages 14 (E14) präpariert. Das Muttertier wurde durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis von 10 %igem Chloralhydrat getötet, der Bauchraum geöffnet und die Embryonen entnommen. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen auf Eis in GBSS/Glukose-Lösung. Die Köpfe der Embryonen wurden abgetrennt und die Gehirne entnommen. Wurden Einzelzellen aus ganzen MGEs gewonnen, so wurden diese aus ganzen Hemisphären präpariert. Wurden dagegen Zellen speziell aus der POA, dem Striatum, oder aus VZ und IMZ der MGE benötigt, so wurden von den Gehirnen mit Hilfe eines Tissue Choppers 225 µm dicke Schnitte angefertigt und die entsprechenden Regionen aus diesen ausgeschnitten (Abb. 4). Das Gewebe wurde in HBSS/Glukose gesammelt. Nach Zugabe von 2,5 %igem Trypsin im Verhältnis 1:5 wurde das Gewebe für 17 min im Wasserbad anverdaut. Um die Enzymreaktion zu stoppen, wurde das HBSS/Trypsin-Gemisch gegen eiskaltes FBS-haltiges Einzelzellmedium ausgetauscht. Anschließend wurde das anverdaute Gewebe durch mehrmaliges Aufziehen mit einer abgerundeten Pasteurpipette homogenisiert und die Zellen mittels Durchsatz durch ein Maschennetz (Maschenweite 130 µm) vereinzelt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen in einer Thoma-Kammer bestimmt. Auf homogen beschichtete Deckgläschen wurden ca. 270 Zellen/mm<sup>2</sup>, auf Streifen-Substraten ca. 750 Zellen/mm<sup>2</sup> in 200 µl Kulturmedium ausgesät. Nach ca. 1 h waren die Zellen auf den Deckgläschen adhäriert und das Medium wurde vorsichtig auf 1 ml aufgefüllt. Die neuronalen Einzelzellen wurden für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Schnittführung an einem coronalen Hirnschnitt**, um die POA, das Striatum, sowie die VZ und IMZ der MGE zu präparieren. Medial ist rechts und dorsal ist oben. GP – Globus pallidus, IMZ – Intermediärzone, NCtx – Neocortex, POA – präoptisches Areal, Str – Striatum, ÜZ – Übergangszone, VZ – Ventrikulärzone.

### Stimulation neuronaler Einzelzellen mit rekombinanten Proteinen

Um die Bindestellen für rekombinantes EphB1-Fc nachzuweisen, wurden die Neurone 1 bis 2 Tage *in vitro* auf Laminin-PLL kultiviert. Anschließend wurden die Deckgläschen in einer neuen Kulturschale mit Medium überschichtet, welches 5 µg/ml EphB1-Fc, geclustert mit 20 µg/ml Alexa488- oder Alexa546-gekoppeltem goat anti-human IgG, enthielt. Nach 30 min Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Zellen kurz mit warmem PBS gespült, um ungebundenes EphB1-Fc zu entfernen und dann mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert.

### Behandlung mit Inhibitoren oder Aktivatoren

Um die Aktivität endogener Src-Kinasen zu blockieren wurde dem Medium der SFK-Inhibitor PP2 (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl) pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin) bzw. das Kontrollpeptid PP3 (4-Amino-7-phenylpyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin) in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M zugeben. Um im Gegensatz dazu die Src-Kinasen zu aktivieren, wurde ein Src-Familie Aktivator verwendet. Dieser stellt eine Phosphopeptidsequenz (EPQYEEIPIYL) dar, welche Mitglieder der Src Familie aktiviert, indem sie an ihre SH2-Domäne bindet (Lu et al., 2009). Dieser Src Aktivator wurde ebenfalls in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M dem Medium zugegeben. Des Weiteren wurde ein FAK-Inhibitor eingesetzt (FAK-Inhibitor 14), welcher die Autophosphorylierung der *focal adhäsion kinase* (FAK) an der Aktivierungsstelle Tyr397 verhindert. Dieser wurde in einer finalen Konzentration von 3  $\mu$ M dem Medium zugesetzt. Die Inkubation erfolgte in allen Fällen über 2 DIV (*days in vitro*), wobei die Hälfte des Mediums nach 1 DIV erneuert wurde.

### Nachweis der Abnahme des pFAK-Levels nach Behandlung mit FAK-Inhibitor 14

Um die Abnahme des pFAK-Levels nach Behandlung mit FAK-Inhibitor 14 zu verifizieren, wurden ganze E14 Gehirne in GBSS/Glukose grob zerkleinert und die Gewebestücke in HBSS/Glukose auf Eis gesammelt. Nach dem Anverdau mit Trypsin wurde das Gewebe 3 min bei 800 U/min zentrifugiert, um anschließend das HBSS/Trypsin-Gemisch leichter abnehmen zu können. Das Gewebe wurde in 2 ml Zellkulturmedium homogenisiert und die Zellsuspension gleichmäßig auf Laminin-PLL-beschichtete Petrischalen aufgeteilt. Dabei wurden etwa 1,5 Gehirne auf eine 6 cm-Schale gerechnet. Die Zellen wurden 4 h in 3 ml Einzelzellmedium kultiviert, dann wurde das Medium ausgetauscht gegen Medium mit 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M oder 7,5  $\mu$ M FAK-Inhibitor 14 und die Zellen 2 DIV bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 1 DIV, sowie 30 min vor dem Ernten der Zellen fand jeweils ein Mediumwechsel statt, bei dem der FAK-Inhibitor erneuert wurde, um eine möglichst optimale Inhibition der Zellen zu erzielen. Anschließend wurde von Dr. Annika Döding ein Westernblot durchgeführt. Dafür wurden die Zellen von den Petrischalen abgelöst und in STEN-Puffer lysiert, welcher Breitspektrum-Protease-Inhibitoren (Sigma) und Phosphatase-Inhibitoren (PhosSTOP, Roche) enthielt. Die Lysate wurden auf NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membranen geblottet. Die Membranen wurden in TBS-T-Puffer mit 5 % Milchpulver 30 min blockiert und dann mit Primärantikörpern gegen Aktin, FAK und pFAK über Nacht (ÜN) bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Antikörper wurden dabei wie in Tabelle 2 beschrieben eingesetzt. Die verwendeten Sekundärantikörper waren Biotin-gekoppelt und wurden mit Hilfe eines DAB-Kits detektiert. Für die Quantifizierung der Abnahme des pFAK-Gehaltes in den mit FAK-Inhibitor 14 behandelten Zellen wurden die Banden mit *ImageJ* vermessen, die FAK-Banden gegen Aktin normalisiert und die pFAK-Banden dann gegen dieses normalisierte FAK normalisiert.

### Transfektion neuronaler Einzelzellen mit siRNA

Mit Hilfe von *small interfering RNA* (siRNA) kann gezielt die Expression eines Genes gestört werden, um die Funktion des kodierten Proteins zu untersuchen. Dabei binden die kurzen siRNA-Stücke an die entsprechende mRNA, welche daraufhin in mehrere Bruchstücke gespalten und abgebaut wird. Die Translation zum jeweiligen Protein wird damit verhindert. In der vorliegenden Arbeit wurde siRNAs gegen die auf den Neuronen exprimierten Eph-Rezeptoren oder -Liganden

EphA4 und Ephrin-B3 verwendet, welche jeweils aus einem Pool von 3 spezifischen 20-25 nt siRNAs bestehen. Die siRNA-Transfektion erfolgte dabei im Streifenassay mittels reverser Lipofektion mit Lipofectamine RNAiMAX. Dafür wurden zunächst 50 µl serumreduziertes OptiMEM mit 10 nM mouse Ephrin-B3-siRNA oder 10 nM mouse EphA4-siRNA, sowie 10 nM Alexa555-markierte dsRNA (BLOCK-iT Alexa Fluor red fluorescent oligo; Alexa555-RNA Dublex) gemischt. Die Alexa-gekoppelte siRNA lag im gleichen Verhältnis wie die regulatorisch wirksame siRNA vor und ermöglichte später eine Detektion der transfizierten Neurone. Als Kontrolle wurden 20 nM Alexa555-RNA Dublex verwendet, um die RNA-Konzentration gleich zu halten. Diesem OptiMEM-siRNA-Gemisch wurde 1 µl Lipofectamine RNAiMAX zugegeben, sanft gemischt und 15 min inkubiert, wobei sich siRNA-haltige Lipofectamine-Vesikel bildeten. In der Zwischenzeit wurden die vorbereiteten Streifenfelder mit 50 µl OptiMEM überschichtet, um ein Austrocknen der auf dem Deckglas haftenden Proteine zu vermeiden. Anschließend wurde das OptiMEM-siRNA-Lipofectamine-Gemisch tropfenweise hinzugefügt. Dieser Mischung wurden 100.000 Zellen in 200 µl antibiotikafreiem Medium zugegeben, sodass auf dem Streifenfeld ein Endvolumen von 300 µl entstand. Nach 5 h Transfektionszeit im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Transfektionsmedium abgenommen, die Zellen einmal mit warmem Medium gewaschen und dann in antibiotikahaltigem Medium 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **Nachweis der Herunterregulation von EphA4 und Ephrin-B3 nach Transfektion mit siRNA**

Um zu bestätigen, dass die siRNA-Transfektion erfolgreich die Expression von EphA4 gemindert hat, wurden MGE-Neurone auf Laminin-PLL kultiviert und nach oben beschriebenem Protokoll mit EphA4-siRNA transfiziert. Nach 2 DIV wurden die Zellen mit 4 % PFA in PBS fixiert und eine Immunfärbung mit einem rabbit anti-EphA4 Antikörper und einem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper durchgeführt. Anschließend wurden mit einem 40x Wasser-Immersions-Objektiv am LSM wie unter 3.4.2. beschrieben Bilder aufgenommen. Mit Hilfe der Software *ImageJ* wurden die Zellkörper von transfizierten und untransfizierten Zellen umrandet und jeweils die Fluoreszenzintensität des EphA4-Signals gemessen. Die Fluoreszenzintensitäten transfizierter Zellen wurden für jedes Bild relativ zur Intensität untransfizierter Zellen berechnet.

Für Ephrin-B3-siRNA-transfizierte Neurone konnte dieses Verfahren nicht angewandt werden, da kein Ephrin-B3-Antikörper verfügbar ist. Daher wurde eine Ephrin-B3 exprimierende NIH3T3 Fibroblasten-Zelllinie verwendet. Diese ist mit einem retroviralen Vektor, pLIG, stabil transfiziert, welcher die humane Ephrin-B3 cDNA und eine Geneticin G418 Resistenz enthält. Die Fibroblasten wurden in Geneticin-haltigem Fibroblastenmedium kultiviert. Von konfluent bewachsenen Schalen wurde zunächst das Medium abgenommen, die Zellen mit warmem PBS gewaschen und 1 h in 10 ml DMEM-F12 im Brutschrank inkubiert. In der Zwischenzeit wurden je 200 pmol Ephrin-B3-siRNA und Alexa555-RNA Dublex in 1 ml OptiMEM gemischt. Als Kontrolle wurden 400 pmol Alexa555-RNA Dublex verwendet. In einem zweiten Ansatz wurden 25 µl Lipofectamine2000 5 min in 1 ml OptiMEM inkubiert. Beide Lösungen wurden vorsichtig vereinigt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise unter sanftem Schwenken zu den Zellen gegeben und im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Nach 5 h Transfektionszeit wurde das Transfektionsmedium gegen Fibroblastenmedium ausgetauscht. Nach 24 h wurden am Axiovert S-100 Fluoreszenzmikroskop von den lebenden Zellen Bilder aufgenommen, um die Transfektionseffizienz

zu bestimmen. Anschließend wurde die RNA der Fibroblasten mit Trizol isoliert, die cDNA synthetisiert und eine RT-PCR gegen Ephrin-B3 und Aktin durchgeführt. Diese letzten Arbeiten wurden freundlicherweise von Diplom-Biologin Katrin Gerstmann durchgeführt. Für die cDNA Synthese wurde dabei die RevertAid MinusM-MuLV Reverse Transkriptase benutzt (42°C für 60 min). Als Primer für die PCR gegen Ephrin-B3 wurden forward, GGGATATGGAAGCTTTGAGAC; reverse, GGTATCACCACCCACAACCAGC und gegen Aktin forward, AGAGGGAAATCGTGCG; reverse, CAATAGTGATGACCTGGCCGT verwendet. Für die Quantifizierung der Expression wurden die Banden mit *ImageJ* vermessen, die Ephrin-B3-Banden gegen Aktin normalisiert und die Transfektions-effizienz mit eingerechnet.

### 3.2.3. Kultivierung neuronaler Explantate im Plasmacot

Zur Analyse des Einflusses von EpB1 auf die Migration neuronaler Zellen wurde ein Migrationsassay durchgeführt, bei dem Explantate aus der POA oder der IMZ in einer dreidimensionalen Matrix aus Hühnchenplasma kultiviert wurden, um ein optimales Ausmigrieren der Zellen zu ermöglichen. Dafür wurden die IMZ und die POA von Mäusen am Embryonaltag 15 wie oben beschrieben aus coronalen Schnitten präpariert und in MZ-Medium gesammelt. Anschließend wurde das Gewebe mit einem kleinen Skalpell per Hand in etwa 200 x 200 µm große Stücke zerteilt. Diese Explantate wurden für 1 h im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit rundeten sie sich ab. Anschließend wurden pro Deckglas ca. 20 Explantate in einen Tropfen Hühnchenplasma überführt und mit Hilfe einer Minutiennadel gleichmäßig verteilt. Das Plasma wurde mit 20 µl Thrombin in GBSS vernetzt und ca. 15 min unter der Sterilbank inkubiert. Danach wurde vorsichtig MZ-Medium aufgefüllt und die Explantate im Brutschrank kultiviert. Nach 20 h *in vitro* wurde das Medium abhängig von den Versuchsbedingungen ausgetauscht gegen Medium mit 5 µg/ml EphB1-Fc oder 5 µg/ml Fc-Protein als Kontrolle bzw. 5 µM Src-Inhibitor PP2 oder 5 µM PP3 als entsprechende Kontrolle. Die Kulturen wurden nach 2 DIV mit 4 % PFA für 45 min fixiert. Anschließend wurde eine Immunfärbung gegen Isl-1 durchgeführt.

### 3.2.4. Darstellung migrierender Neurone in coronalen Schnitten

Um die Migration von Neuronen unter organotypischen Bedingungen direkt im Schnitt zu untersuchen wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Zum einen wurden auf Wildtyp-Schnitte EGFP-Explantate homotypisch transplantiert, aus denen grünfluoreszierende Zellen in das Schnittgewebe ausmigrierten. Diese Methode wurde von Dr. Geraldine Zimmer durchgeführt. Zum anderen wurden migrierende Neurone direkt im Schnitt mit Cell Tracker C2925 angefärbt. Diese Methode färbt Zellen direkt in ihrem Gewebeverband an und ist daher weniger artifiziell als eine Transplantation. In beiden Fällen wurde die Migration der Neurone durch die Behandlung mit Eph-Rezeptoren beeinflusst, welche an exprimierte Liganden binden und diese blockieren.

#### Homotypische Transplantation EGFP-exprimierender Explantate

Es wurden EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)-exprimierende Mäuse des Stammes C57BL/6J am Embryonaltag 14 verwendet. Dafür wurden EGFP-heterozygote Tiere mit Wildtyp-Tieren verpaart, wodurch sowohl EGFP-heterozygote als auch Wildtyp-Nachkommen entstanden. Die Köpfe der Embryonen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop in Wildtyp- und EGFP-Tiere aufgeteilt. Die

Gehirne wurden getrennt herauspräpariert und mit dem Tissue Chopper coronal 225 µm dick geschnitten und in GBSS/Glukose gesammelt. Die EGFP-Schnitte wurden für 30 min bei 4 °C gelagert. In dieser Zeit wurden Wildtyp-Schnitte, welche die POA, MGE und LGE enthielten, auf runde PLL (10 µg/ml) beschichtete Deckgläser aufgebracht und in 450 µl Medium für Schnittkulturen 30 min im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und ein Explantat aus der Ventrikularzone der MGE eines EGFP-Schnittes homotypisch auf den Wildtyp-Schnitt transplantiert (Abb. 5B). Dabei war darauf zu achten, dass der Schnitt trotz entferntem Medium ausreichend feucht gehalten wurde, um ein Austrocknen zu verhindern. War das Explantat am Gewebe adhärirt, wurde das Medium vorsichtig wieder aufgefüllt, um ein Abschwimmen des Explantates zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte für 2 DIV in 450 µl Medium. Nach 1 DIV fand ein Mediumwechsel statt, bei dem 100 µl Medium durch 150 µl frisches ersetzt wurden. Diese Transplantationsexperimente wurden von Dr. Geraldine Zimmer durchgeführt.

### **Markierung migrierender Neurone mit Cell Tracker**

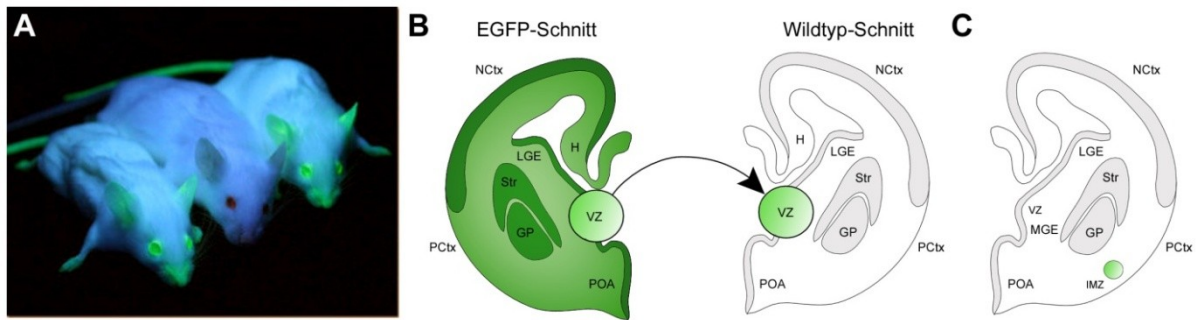
Es fanden E14 Wildtyp-Embryonen Verwendung, deren Gehirne in 4 % low-melt Agarose in Krebspuffer eingebettet wurden. Nach dem Aushärten der Agarose wurden von diesen in eiskaltem Krebspuffer an einem Vibratom 300 µm dicke Coronalschnitte angefertigt, welche in postholding-Puffer auf Eis gesammelt wurden. Anschließend wurden die Schnitte auf Nucleopore Polycarbonatmembranen gezogen und 1 h in serumfreiem Medium für Schnitte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Um den Cell Tracker auf die Schnitte aufzubringen, mussten Wolframkugeln mit diesem beschichtet werden. Dazu wurden 10 mM Cell Tracker green C2925 mit Dichlormethan auf 1 mM verdünnt. 100 µl dieser Lösung wurden dann mit 50 mg Wolframkugeln (Durchmesser 0,7 µm) auf einem Objektträger vermischt und dünn ausgestrichen. Nach Verdampfen des Dichlormethans wurden die beschichteten Wolframkugeln bei 4 °C gelagert. Zum Applizieren der Wolframkugeln wurde die Membran mit dem Schnitt in den Deckel einer Petrischale gelegt und eventuell noch anhaftendes Medium entfernt. Anschließend wurden die Cell Tracker-beschichteten Wolframkugeln mit Hilfe einer ausgezogenen Glaskapillare in die IMZ der MGE, dicht vor das Striatum appliziert (Abb. 5C). Nach 2 h Inkubation in serumfreiem Medium wurde das Medium gegen Komplettmedium ersetzt und die Gehirnschnitte 1 DIV bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **Zugabe rekombinanter Proteine**

Zum Blockieren von Ephrin-Liganden auf migrierenden Neuronen oder im Gewebe wurden rekombinante Eph-Rezeptoren in einer Konzentration von 5 µg/ml dem Medium zugesetzt. In den Transplantationsexperimenten wurden Ephrin-A-Liganden durch Zugabe von EphA6-Fc blockiert, während in den Cell Tracker-Experimenten EphB1-Fc verwendet wurde, um B-Liganden zu blockieren.





**Abb. 5: Darstellung migrierender Neurone in Gehirnschnitten.** (A) Eine Wildtyp-Maus flankiert von zwei EGFP-Mäusen unter UV-Licht (aus Moen et al., 2012). (B) Schematische Darstellung der homotypischen Transplantation eines EGFP-Explantates aus der VZ der MGE auf einen Wildtyp-Schnitt. (C) Schematische Darstellung der Lokalisation des Cell Trackers (grün) in einem coronalen Hirnschnitt. GP – Globus pallidus, H – Hippocampus, IMZ – Intermediärzone, LGE – laterale ganglionische Eminenz, MGE – mediale ganglionische Eminenz, NCtx – Neocortex, PCtx – Piriformer Cortex, POA – präoptisches Areal, Str – Striatum, VZ – Ventrikulärzone.

### 3.2.5. *in situ*-Hybridisierung an Kryostatschnitten

Mittels *in situ*-Hybridisierung können Nukleinsäuren in Geweben oder einzelnen Zellen nachgewiesen werden (*in situ*). Dabei wird eine künstlich hergestellte Sonde verwendet, die an die nachzuweisende RNA hybridisiert, da sie eine zu dieser komplementäre Nukleinsäure-Sequenz besitzt. In dieser Arbeit wurden Digoxigenin-gekoppelte RNA-Sonden verwendet, die über eine farbgebende Enzymreaktion mittels Alkalischer Phosphatase detektiert wurden. Für alle diese Arbeiten waren RNase-freie Bedingungen erforderlich um einer Degradation der RNA durch Ribonukleasen vorzubeugen. Dazu wurden hitzestabile Materialien für 3 h im Trockenschrank auf 180 °C erhitzt oder RNase-freie Einwegmaterialien verwendet. Weiterhin wurden Arbeitsplätze und Handschuhe mit RNase away behandelt, sowie Lösungen Diethylpyrocarbonat (DEPC) im Verhältnis 1:1000 zugesetzt und diese anschließend autoklaviert.

Die *in situ*-Hybridisierungen gegen EphA4 und Ephrin-A3 wurden freundlicherweise von Diplom-Biologin Sandra Barchmann durchgeführt, während die gegen EphB1 und Ephrin-B3 von Diplom-Biologin Katrin Gerstmann gefertigt wurden. Kurz dargestellt wurden dafür Köpfe von E14 und E15 Wildtyp-Embryonen frisch in flüssigem Stickstoff eingefroren und von diesen 18 µm dicke coronale Kryostatschnitte angefertigt, welche auf Superfrost Ultra Plus-Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden 2-3 h bei 56 °C getrocknet und dann für 10 min in 4 % PFA/PBS<sub>DT</sub> fixiert. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,2 M HCl für 10 min, anschließend wurden die Schnitte für 15 min mit 5 mM Acetanhydrid in 0,1 M TEA acetyliert. Die Schnitte wurden über Nacht mit 3 µg/ml der RNA-Sonden hybridisiert, wobei sich die Hybridisierungstemperatur nach der jeweiligen verwendeten Sonde richtete (vergleiche Tabelle 4). Die Digoxigenin-gekoppelten RNA-Sonden wurden anschließend über eine farbgebende Enzymreaktion detektiert. Dafür wurden die Schnitte erst 2-3 h in 2 % Blockierungsreagenz und anschließend mit einem Alkalische Phosphatase-konjugierten anti-DIG Fab-Fragment inkubiert (vgl. Tabelle 2). Die Farbreaktion erfolgte dann durch Umsatz der Substrate NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat). Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 4-6 h für EphA4 und EphB1, sowie über Nacht für Ephrin-A3 und Ephrin-B3. Zuletzt wurden die Schnitte kurz in PBS gewaschen, in Mowiol eingebettet und bei 4 °C gelagert.

### **3.3. Immunfluoreszenzfärbungen**

#### **3.3.1. Immunhistochemie**

Für die immunhistochemischen Markierungen wurden embryonale Gehirne der Altersstufen E14 und E16 verwendet. Dazu wurden die Köpfe der Embryonen 4 h in 4 % PFA in PBS bei RT immersionsfixiert. Zum Gefrierschutz wurden die Köpfe anschließend ca. 5 h bei 4 °C in 15 %ige Sucroselösung gegeben, bis sie zu Boden sanken. Danach wurde die Lösung gegen 30 %ige Sucroselösung ausgetauscht, worin die Gehirne über Nacht verblieben. Zuletzt wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Von den Köpfen wurden 18 µm dicke coronale Kryostatschnitte angefertigt, welche auf Superfrost Ultra Plus-Objektträger aufgezogen wurden. Vor Beginn der Immunfärbung wurden die Schnitte 2 min nachfixiert und überschüssiges PFA in drei 5-minütigen Waschschritten mit PBS entfernt. Bei der Verwendung von Antikörpern gegen Isl-1 und Lhx6 war zudem ein Antigen-Retrieval nötig, bei dem die Schnitte für 2 min mit 70 °C heißer Epitope Retrieval Solution (Leica) behandelt wurden. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, verblieben die Schnitte anschließend 1 h bei RT in Blockierungsreagenz. Im Zuge dessen wurden die Schnitte durch das in der Lösung enthaltene Triton X-100 permeabilisiert. Die Inkubation mit dem in Blockierungsreagenz verdünnten Primärantikörper (vgl. Tabelle 2) erfolgte über Nacht bei RT in einer feuchten Kammer. Ungebundener Antikörper wurde anschließend durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer unter sanftem Schütteln entfernt und die Schnitte lichtgeschützt mit dem in Blockierungsreagenz verdünnten Sekundärantikörper inkubiert (vgl. Tabelle 2). Bei Mehrfachmarkierungen wurden die Schnitte in einer Mixtur der verschiedenen Primär- oder Sekundärantikörper inkubiert. Es folgten fünf weitere Waschschrritte für jeweils 10 min unter leichtem Schütteln, bevor die Zellkerne mit DAPI (100 ng/ml in PBS) für 20 min bei RT gefärbt wurden. Zuletzt wurden die Präparate kurz in Aqua dest. gewaschen, in Mowiol eingebettet und bei 4 °C gelagert.

#### **3.3.2. Immunzytochemie**

Die Färbung von neuronalen Einzelzellen und Explantaten wurde größtenteils wie die unter 3.3.1 beschriebenen immunhistochemischen Markierungen durchgeführt. Einzelzellkulturen wurden für 15 min, Explantate für 40 min in PFA bei RT fixiert. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen 1 h bei RT mit Blockierungsreagenz blockiert, sowie die Zellen mit dem enthaltenen Triton X-100 permeabilisiert. Ein Antigen-Retrieval war bei diesen Kulturen nicht nötig. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer, wobei Einzelzellkulturen dabei bei 4 °C gelagert wurden und Explantate bei RT verblieben. Der Sekundärantikörper wurde in beiden Fällen lichtgeschützt bei RT inkubiert (vgl. Tabelle 2). Bei Mehrfachmarkierungen wurden die Primär- oder Sekundärantikörper jeweils als Mixtur appliziert. Nach der Kernfärbung mit DAPI wurden die Deckgläschen auf Objektträgern mit Mowiol eingebettet und bei 4 °C gelagert.

### 3.4. Mikroskopie

#### 3.4.1. Fluoreszenzmikroskopie

Für die meisten mikroskopischen Aufnahmen wurde ein inverses ZEISS-Fluoreszenzmikroskop, Axiovert S-100 in Kombination mit einer digitalen Farbkamera (Spot, Diagnostic Instruments) und dazugehöriger Software verwendet. *In situ* Hybridisierungen wurden mit einem 5x Objektiv (Zeiss, PlanNeofluar; numerische Apertur (NA) 0,15) unter Durchlicht aufgenommen. Für Fluoreszenzaufnahmen verschiedener Experimente kamen ein 10x Objektiv (Zeiss, PlanNeofluar; NA 0,6) oder ein 20x Phasenkontrast-Objektiv (Zeiss, PlanNeofluar; NA 0,5), teilweise in Kombination mit einem 1,6x Optovar, zum Einsatz. Für Streifenexperimente wurde das 20x Phasenkontrast-Objektiv mit dem 1,6x Optovar in Kombination mit Fluoreszenz- und Durchlicht benutzt, um sowohl die Zellen als auch die Streifen darstellen zu können.

#### 3.4.2. Laser-Scanning-Mikroskopie

Es wurden ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) 510 von Zeiss und die ZEN 2009 Software verwendet. Weiterhin kamen ein 10x Objektiv (Zeiss, NA 0,6) für die Aufnahme von Schnitten und ein 40x Wasser-Immersions-Objektiv (NA 1,2) zum Einsatz. Dabei gewährleistet die große numerische Apertur dieses Objektives eine hohe Auflösung, was es besonders geeignet für die detaillierte Darstellung von Einzelzellen macht. Grün fluoreszierende Farbstoffe wurden mit einem Argon-Laser mit 488 nm Wellenlänge angeregt. Als Emissionsfilter wurde dabei ein Bandpass 500-550 nm benutzt. Für rote Farbstoffe wurde ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm in Kombination mit einem Langpass-Filter 560 nm benutzt. DAPI gefärbte Zellkerne wurden mit Hilfe eines Zwei-Photonen Titan-Saphir-Lasers (Mai Tai; Spectra Physics) mit einer Wellenlänge von 780 nm und einem Bandpass 435-485 nm als Emissionsfilter dargestellt. Für den Nachweis der Kolo-kalisation von EphB1-Bindestellen und pSrc bzw. pFAK an Isl-1-positiven und -negativen Zellen wurden Tripelfärbungen angefertigt. Dabei wurden die Fluorophore sowie die benutzten Emissionsfiltersysteme so gewählt, dass es zu keiner Überlappung der Emissionsspektren kam und die verschiedenen Kanäle sauber voneinander getrennt werden konnten. Als Farbstoffe wurden daher Cy2 mit einem Emissionsmaximum von 506 nm, Alexa546 und Alexa633 gewählt. Cy2 (pSrc; pFAK) wurde mittels eines Argon-Lasers (Wellenlänge 488 nm) und einem Bandpass-Filter 500-550 nm detektiert. Für Alexa546 (EphB1-Fc) kam ein Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm zum Einsatz, in Kombination mit einem Bandpass-Filterset, das die Emission auf 565-615 nm eingrenzte. Damit wird dieser Farbstoff zwar nicht optimal angeregt, da sein Emissionsmaximum bei 573 nm liegt, jedoch wurde so eine klare Abgrenzung zum dritten eingesetzten Fluorophor, Alexa633, gewährleistet. Für Alexa633 (Isl-1) wurde ein Helium-Neon-Laser mit 633 nm Wellenlänge und ein Langpass, der alle Wellenlängen über 650 nm durchließ, benutzt. DAPI-gefärbte Zellkerne wurden wie oben beschrieben detektiert. Für alle Fluorophore kam ein Hauptfarbteiler UV/488/543/633 nm zum Einsatz. Bei den durchgeführten Kolo-kalisationsstudien wurde darauf geachtet, die Dicke des optischen Schnittes für beide Kanäle gleich groß zu wählen, um so die detektierten Fluoreszenzen auf eine Ebene zu beschränken und falsch positive Überlappungen zu vermeiden. Der Nachweis der

Kolokalisation wurde dabei über die Ortho-Funktion der ZEN 2009 Software erbracht, bei der ein einzelnes Bild aus dem z-Stapel orthogonal betrachtet werden kann.

### 3.5. Analyse der Experimente

#### 3.5.1. Statistik

Für die statistischen Analysen wurde ein studentscher-t-Test für abhängige oder unabhängige Stichproben in Excel durchgeführt. Im Falle der Verteilung der mit Cell Tracker gefärbten Neurone im Schnitt wurde eine einfache Varianzanalyse (one-way ANOVA; R Software) durchgeführt. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM). Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Damit entspricht \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 3.5.2. Auswertung der Streifenassays

Durch die Kombination von Fluoreszenz- und Durchlicht bei der Aufnahme der Bilder konnten sowohl die Streifen als auch die darauf befindlichen Zellen gleichzeitig aufgenommen werden. Waren die Zellen zusätzlich gegen Isl-1 gefärbt oder mit siRNA transfiziert, wurden die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen mit dem jeweiligen Bild, das die Zellen und Streifen enthielt, mittels der *merge*-Funktion der Spot-Software fusioniert. Die Verteilung der Neuronen auf den unterschiedlichen Streifen wurde mit Hilfe der Software *ImageJ* (*cell counter plug in*) ermittelt. Dabei war nur die Lage des Somas von Bedeutung. Waren die Zellen gegen Isl-1 gefärbt oder mit siRNA transfiziert, wurde die Verteilung der Neurone getrennt für markierte und unmarkierte bzw. transfizierte und untransfizierte Zellen ermittelt. Die ausgezählte Anzahl der Zellen wurde entsprechend der methodisch bedingten leicht variierenden Streifenbreite korrigiert. Es wurde ein gepaarter t-Test für abhängige Stichproben durchgeführt; n bezeichnet die Anzahl ausgewerteter Bilder.

#### 3.5.3. Bestimmung des pSrc-Levels von Neuronen im Streifenassay

Zur Quantifizierung des pSrc-Levels dissoziierter Isl-1<sup>+</sup> und Isl-1<sup>-</sup> Zellen im Streifenassay wurden wie oben beschrieben Bilder am LSM aufgenommen. Für jedes Bild wurde dann mit Hilfe von *ImageJ* das pSrc Signal der Zellen getrennt nach Isl-1-positiven und Isl-1-negativen Zellen und nach EphB1-Fc- oder Kontroll-Streifen gemessen. Dafür wurde der Kanal, der dem pSrc-Signal entsprach, exportiert. Auf diesen Bildern wurden die Zellen mit *ImageJ* umrandet und die Fluoreszenzintensität gemessen. Diese Werte wurden anschließend gegen das Hintergrundsignal korrigiert. Die Signalstärken wurden dann pro Bild zueinander ins Verhältnis gesetzt und statistisch verglichen; n bezeichnet die Anzahl ausgewerteter Bilder.

#### 3.5.4. Auswertung der Explantatkulturen im Plasmaclot

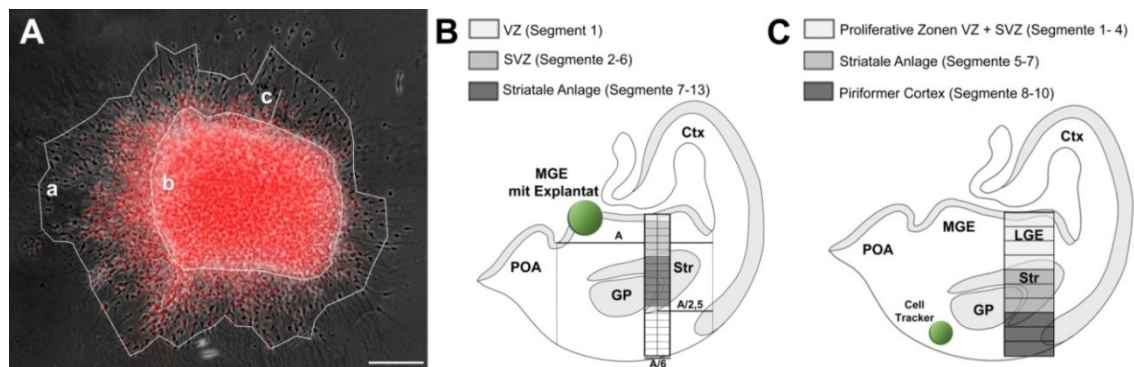
Für die Analyse des Migrationsassays wurde für jedes ausgewachsene Explantat ein Migrationsindex berechnet. Dafür wurde die Fläche ausmigrierter Zellen mit *ImageJ* ermittelt und durch die Explantatfläche geteilt (Abb. 6A). Je größer dieser Quotient war, umso weiter waren demnach die Zellen aus dem jeweiligen Explantat ausmigriert. Zusätzlich wurde für jedes Explantat die Anzahl ausmigrierter Isl-1-positiver Zellen und ihre kürzeste Entfernung senkrecht zum Explantatrand ermittelt (Abb. 6A; Strecke c), sowie die Strecke der drei am weitesten migrierten Isl-1<sup>+</sup> und Isl-1<sup>-</sup> Neurone.

Während für den Migrationsindex jedes ausgewachsene Explantat ausgewertet wurde, wurden für die Auswertung des Migrationsverhaltens Isl-1-positiver Neurone nur solche Explantate verwendet, bei denen die Isl-1-Markierung bis zum Rand des Explantates reichte, sodass Isl-1-positive Zellen das Explantat auch verlassen konnten, wodurch falsch negative Ergebnisse vermieden wurden. Es wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt; n bezeichnet die Anzahl ausgewerteter Explantate.

### 3.5.5. Quantifizierung der Migration von Neuronen in coronalen Schnitten

#### Analyse der Migration in *in vitro*-Kulturen

Bei beiden zum Einsatz gekommenen *in vitro*-Methoden, der Transplantation von EGFP-Explantaten sowie der Markierung von migrierenden Zellen mittels Cell Tracker, wurden von den Schnitten wie oben beschrieben Bilder am LSM aufgenommen. Die Einzelbilder wurden mit Hilfe der *stiching*-funktion der ZEN-Software zusammengesetzt. Für die Auswertung des Migrationsmusters der EGFP-Zellen wurde eine Region in der LGE gewählt, in der die Verteilung der Fluoreszenzintensität über einen Balken von der VZ der LGE zum Piriformen Cortex gemessen wurde (Abb. 6B). Dafür mussten alle Schnitte zuvor normiert werden, da sie sich in ihrer Größe und Ausdehnung unterschieden. Dazu wurde die Längsausdehnung jedes Schnittes von Beginn des Cortex bis zum Beginn der POA bestimmt (Strecke A). Über die LGE wurde dann in dorso-ventraler Ausrichtung ein Balken gelegt, welcher in 20 gleichgroße Segmente unterteilt wurde. Die Mitte dieses Balkens wurde dabei bei A/2,5 festgelegt, die Breite eines Segmentes als A/6. Für jedes Segment wurde die Fluoreszenzintensität mit der Software *ImageJ* bestimmt, wobei der höchste gemessene Wert auf 100 % gesetzt wurde und die niedrigste Fluoreszenzintensität auf 0 %. Die Zuordnung der einzelnen Segmente zu anatomischen Regionen erfolgte nach (Jacobowitz and Abbott, 1998), wobei das Segment 1 die VZ, die Segmente 2-6 die SVZ und die Segmente 7-13 die striatale Anlage repräsentieren. Es wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt; n bezeichnet die Anzahl ausgewerteter Schnitte.



**Abb. 6: Analyse von *in vitro* Experimenten.** (A) Veranschaulichung der aufgenommenen Messwerte bei der Auswertung von Explantatkulturen. Aus dem Quotienten aus der Fläche ausmigrierter Neurone (a) und der Explantatfläche (b) errechnete sich der Migrationsindex, welcher Auskunft über das allgemeine Migrationsverhalten aller Zellen eines Explantates gibt. Für die Fläche a wurde dabei der Bereich markiert, in dem sich der Großteil der ausmigrierten Zellen befand. Zusätzlich wurde von allen Isl-1-positiven Zellen ihre kürzeste Entfernung zum Explantatrand (c) ermittelt. Aus diesem Wert und der Anzahl ausmigrierter Isl-1<sup>+</sup> Zellen ließen sich Rückschlüsse auf die Migrationsfähigkeit dieser Zellpopulation ziehen. (B) Schematische Darstellung der Vermessung der Schnitte für die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten in einer Säule über die LGE nach Transplantation eines EGFP-Explantates. A = Abstand von Beginn des Cortex bis zum Beginn der POA; Die Mittelachse des Balkens lag bei A/2,5 und deren Breite bei A/6. (C) Schematische Darstellung der Quantifizierung des Migrationsmusters markierter Zellen in coronalen Schnitten in einer Säule über die LGE nach Applikation von Cell Tracker. Ctx – Cortex, GP – Globus pallidus, LGE – laterale ganglionische Eminenz, MGE – mediale ganglionische Eminenz, POA – präoptisches Areal, Str – Striatum. Maßstab in A: 100 µm.

Die Analyse Cell Tracker gefärbter Zellen erfolgte ähnlich, jedoch waren bei dieser Methode zu wenige Zellen für eine Fluoreszenzintensitätsmessung gefärbt. Daher wurden Cell Tracker markierte Neurone in der Säule über die LGE mit *ImageJ* gezählt. Der Sektor wurde in 10 gleichgroße Segmente unterteilt, wobei die Segmente 1-4 zu den Proliferativen Zonen (VZ und SVZ) zusammengefasst wurden, die Segmente 5-7 die striatale Anlage repräsentierten und die Segmente 8-10 den piriformen Cortex (Abb. 6C). Die relative Anzahl der Zellen pro Segment wurde ins Verhältnis gesetzt zur Gesamtanzahl aller migrierenden Zellen in jedem Schnitt. Es wurde eine *one-way ANOVA* durchgeführt; n bezeichnet die Anzahl ausgewerteter Schnitte.

### Analyse der Migrationsströme an *in vivo*-Schnitten

Um eine Aussage über die Migration der untersuchten Zellpopulationen direkt *in vivo* machen zu können wurden Kryostatschnitte von Wildtyp und Ephrin-B3-knockout-Tieren gegen Lhx6, Calbindin und Isl-1 gefärbt. Zur Quantifizierung der Anzahl Lhx6<sup>+</sup> und Calbindin<sup>+</sup> Interneurone im Striatum wurden am Axiovert S-100-Mikroskop Bilder in 160facher Vergrößerung von den markierten Zellen und den DAPI-gefärbten Zellkernen aufgenommen und mit Hilfe der Microsoft ICE-Software je Schnitt zu einem Bild zusammengesetzt. Mit *ImageJ* wurde auf den DAPI-Bildern jeweils das Striatum markiert, welches durch die DAPI-Färbung gut sichtbar war, und dessen Fläche gemessen. Diese Markierung wurde dann auf das Bild mit der Immunmarkierung übertragen und mit Hilfe der Koordinatenanzeige von *ImageJ* exakt ausgerichtet. Dann wurden alle Lhx6- bzw. Calbindin-positiven Zellen innerhalb dieser Markierung ausgezählt und ihre Anzahl auf die Fläche normiert. Es wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt; n bezeichnet die Anzahl ausgewerteter Schnitte.

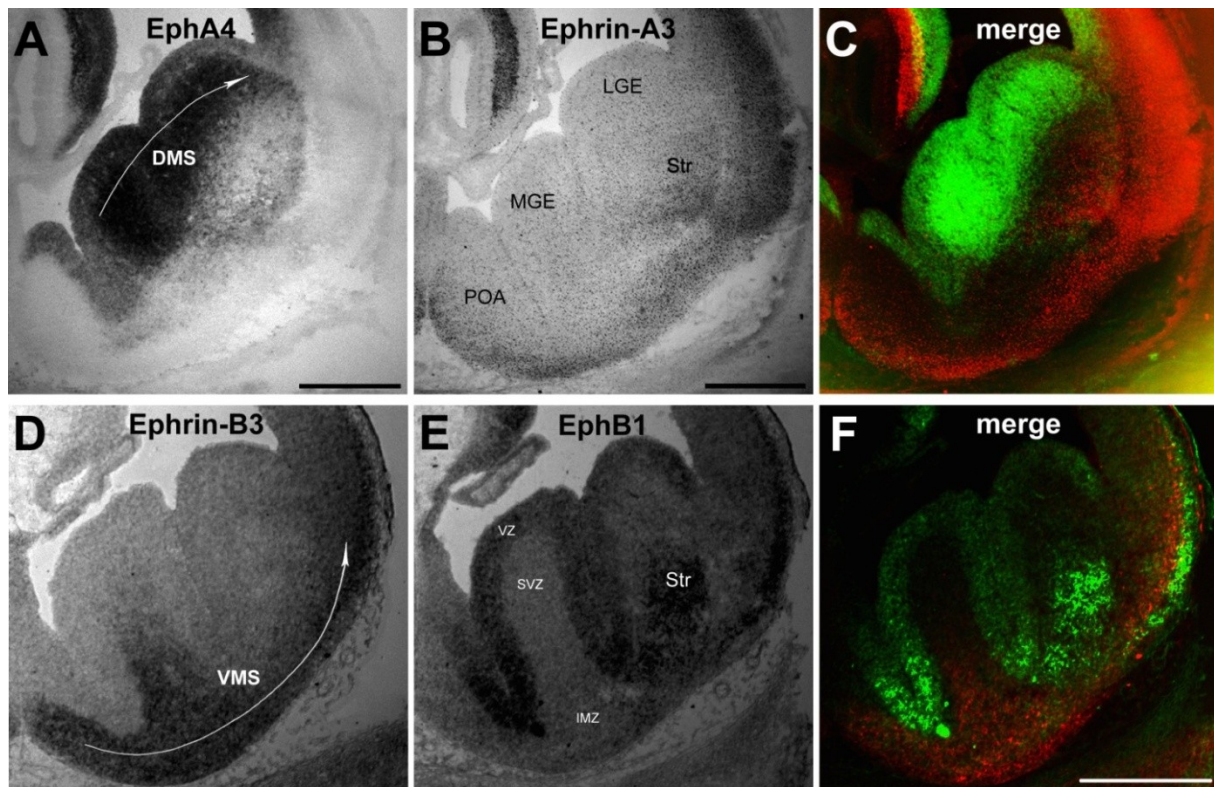
Für die Analyse des Migrationsstromes Isl-1-positiver Zellen wurde das Isl-1-Signal jedes Schnittes am Axiovert S-100-Mikroskop in 160facher Vergrößerung abfotografiert und die Bilder mit Hilfe der Microsoft ICE-Software jeweils zu einem Bild zusammengesetzt. Für die Bestimmung der Fläche, welche die markierten Zellen einnehmen, wurde der Bereich vermessen, in dem sich der Großteil der Isl-1<sup>+</sup> Neurone befand, ausgehend vom Sulcus zwischen POA und MGE. Des Weiteren wurde die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten in einem Balken über die MGE und die LGE gemessen. Dazu wurden die Bilder der Schnitte in Photoshop CS3 wie in Abb. 6B gedreht und jeweils eine in jedem Schnitt gleichbreite Säule der LGE und der MGE in dorsoventraler Ausrichtung ausgeschnitten (Abb. 30D). Dabei wurde v.a. in der MGE darauf geachtet, innerhalb der Eminenz zu bleiben um später nicht die stärker gefärbten Ränder der Sulci mit zu messen und die Ergebnisse so zu verfälschen. Alle Ausschnitte wurden anschließend auf dieselbe Pixelhöhe reduziert und mit *ImageJ* der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Hier wurden 60 Segmente gewählt, um einen feineren Kurvenverlauf zu erhalten.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Komplementäre Expression von Ephrinen und Eph-Rezeptoren im basalen Telencephalon

Während des Höhepunkts der Interneuronenmigration, der in der Maus am Embryonaltag 14 liegt, wandern corticale Interneurone aus verschiedenen Ursprungsgebieten im basalen Telencephalon in den Cortex ein. Dabei migrieren sie tangential zur Hirnoberfläche auf verschiedenen streng regulierten Routen: einem dorsalen Migrationsstrom (DMS) und einem ventralen Migrationsstrom (VMS) (Corbin and Butt, 2011, Zimmer et al., 2011). Diese beiden Ströme verlaufen um die striatale Anlage herum, welche als Nicht-Zielregion von den corticalen Interneuronen vermieden wird. Dabei wurde bereits mehrfach gezeigt, dass Mitglieder des Eph/Ephrin-Systems als Lenkungsfaktoren für tangential migrierende Interneurone dienen (Zimmer et al., 2008, Rudolph et al., 2010, Zimmer et al., 2011). *In situ*-Hybridisierungen gegen verschiedene Vertreter des Eph/Ephrin-Systems belegten, dass sowohl Liganden als auch Rezeptoren des A- und des B-Systems im basalen Telencephalon exprimiert werden. EphA4 zeigte dabei ein starkes Signal in der VZ und SVZ der ganglionischen Eminenzen, dem dorsalen Migrationsstrom corticaler Interneurone (Abb. 7A). Im Gegensatz dazu fand sich der Ligand Ephrin-A3 in diesem Entwicklungsstadium im Striatum (Abb. 7B). Im Bereich des ventralen Migrationsstroms corticaler Interneurone mit Ursprung in der POA war dagegen Ephrin-B3 zu finden, mit einem starken Signal in der POA und der IMZ der MGE, welches zum piriformen Cortex hin langsam auslief (Abb. 7D). Der Rezeptor EphB1 wird ebenfalls im Striatum sowie in der VZ der POA und der ganglionischen Eminenzen exprimiert (Abb. 7E). Alle diese Regionen werden von corticalen Interneuronen vermieden. Ausgehend von möglichen Bindungspartnern (Martinez and Soriano, 2005) ergibt sich somit ein komplementäres Expressionsmuster für EphA4 im DMS und Ephrin-A3 exprimiert im Striatum, sowie für Ephrin-B3 im VMS und EphB1 im Striatum, illustriert durch die Falschfarbendarstellungen in Abb. 7C und F. Diese komplementäre Expression von Lenkungsfaktoren deutet darauf hin, dass Ephrin-A3 und EphB1 als repulsive Faktoren für die corticalen Interneurone dienen, welche die jeweiligen Bindungspartner EphA4 bzw. Ephrin-B3 tragen. Somit wird eine Invasion des Striatums verhindert.





**Abb. 7: Komplementäre Expressionsmuster im basalen Telencephalon.** *In situ* Hybridisierungen an coronalen E14 (D-E) und E15 (A, B) Gehirnschnitten zeigen im dorsalen Migrationsstrom eine starke Expression von EphA4 (A) in der SVZ der ganglionischen Eminenzen, während ein schwächeres Signal in der VZ und teilweise auch in der striatalen Anlage zu finden ist. Der entsprechende Ligand Ephrin-A3 wird dabei im Striatum exprimiert (B). Im ventralen Migrationsstrom zeigt Ephrin-B3 eine starke Färbung in der POA und der Intermediärzone (IMZ) ventral des Striatums (D), während der Rezeptor EphB1 ein starkes Signal im Striatum, als auch in der Ventrikulärzone zeigt (E). C, F, Falschfarbenüberlagerungen von A und B (C) sowie von D und E (F) verdeutlichen die komplementäre Expression dieser Lenkungsfaktoren für den dorsalen bzw. ventralen Migrationsweg. Lateral ist rechts und medial ist links. DMS – dorsaler Migrationsstrom, IMZ – Intermediärzone, LGE – laterale ganglionische Eminenz, MGE – mediale ganglionische Eminenz, POA – präoptisches Areal, Str – Striatum, SVZ – Subventrikulärzone, VMS – Ventraler Migrationsstrom, VZ – Ventrikulärzone. Maßstab 500 µm.

## 4.2. Invasion des Striatums nach Blockieren von Ephrin-Liganden

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die corticalen Interneurone, die in der MGE und der POA geboren werden, in getrennten Korridoren Richtung Cortex migrieren, dem DMS und dem VMS (Zimmer et al., 2011). Dabei vermeiden die Zellen beider Ströme das Striatum, in dem Ephrin-A3 und EphB1 exprimiert werden. Die Neurone selbst exprimieren EphA4 im DMS bzw. Ephrin-B3 im VMS. Daher sollte die Migration corticaler Interneurone beider Ströme untersucht werden, nachdem Ephrin-Liganden auf den migrierenden Zellen oder im Gewebe blockiert wurden.

### 4.2.1. Darstellung und Quantifizierung migrierender Neurone *in vitro*

Für diesen Zweck wurde ein *in vitro* Ansatz gewählt, bei dem die tangentielle Migration corticaler Interneurone dargestellt und durch Zugabe rekombinanter Eph-Rezeptoren beeinflusst werden konnte. Um die migrierenden Zellen auf coronalen Schnitten *in vitro* zu visualisieren, wurden zwei verschiedene Methoden gewählt. Zur Darstellung migrierender corticaler Interneurone im DMS wurden auf E14 Wildtyp-Schnitte Explantate aus der MGE von EGFP-exprimierenden Mäusen homotypisch transplantiert, aus denen grünfluoreszierende EGFP-Zellen in das Schnittgewebe ausmigrierten.



Dagegen wurden migrierende Neurone im VMS direkt im Schnitt mit Cell Tracker C2925 angefärbt. Dabei wurden mit Cell Tracker beschichtete Wolframkugeln vor das Striatum in den ventralen Migrationsstrom appliziert. Das Cell Tracker-Reagens diffundiert frei durch die Membran lebender Zellen, wo es dann mit intrazellulären Komponenten zu einem fluoreszierenden Produkt reagiert. Dieses ist membranundurchlässig, wodurch gewährleistet wird, dass der Farbstoff nicht auf Nachbarzellen übertragen wird. Diese Methode färbt Zellen direkt im Gewebe an und ist daher weniger artifiziell als eine Transplantation. Der Nachteil besteht jedoch darin, dass die Fluoreszenz des Cell Tracker-Farbstoffs deutlich weniger intensiv und stabil gegenüber der Fluoreszenz der EGFP-Neurone ist. Die Aufnahme von Bildern am Laser-Scanning-Mikroskop musste daher bereits am Folgetag der Fixierung der Schnitte erfolgen, um einem zu starken Ausbleichen des Farbstoffes zuvorzukommen.

Um das Migrationsmuster der Interneurone des dorsalen und ventralen Migrationsstroms im basalen Telencephalon zu quantifizieren, wurde eine Region in der LGE gewählt, in der die Verteilung der Zellen über einen Ausschnitt in dorso-ventraler Ausrichtung von der VZ der LGE zum piriformen Cortex bestimmt wurde. Dieser Bereich wurde relativ zu den Ausmaßen des Schnittes gewählt und in 20 bzw. 10 gleichgroße Segmente unterteilt (siehe Material und Methoden, Abschnitt 3.5.5 „Analyse der Migration in *in vitro*-Kulturen“). Die einzelnen Segmente wurden anatomischen Regionen zugeordnet, wobei für die EGFP-Neurone im DMS das Segment 1 die VZ, die Segmente 2-6 die SVZ und die Segmente 7-13 die striatale Anlage repräsentieren (Abb. 6B). Für die Cell Tracker markierten Zellen im VMS wurden die Segmente 1-4 zu den Proliferativen Zonen (VZ und SVZ) zusammengefasst, während die Segmente 5-7 für die striatale Anlage und die Segmente 8-10 für den piriformen Cortex stehen (Abb. 6C). Im Falle der Transplantation von EGFP-Explantaten aus der MGE wurde die Verteilung der Zellen des dorsalen Migrationsstromes durch Messung der Fluoreszenzintensität in dem Balken über die LGE ermittelt, wobei der höchste gemessene Wert für jeden Schnitt auf 100 % normiert wurde. Im Gegensatz dazu lieferte die Cell Tracker-Methode zu wenig angefärbte Zellen für eine Fluoreszenzintensitätsmessung, weshalb markierte Neurone des ventralen Migrationsstromes in diesem Bereich ausgezählt wurden. Die relative Anzahl der Zellen pro Segment wurde dabei ins Verhältnis gesetzt zur Gesamtanzahl aller migrierenden Zellen in jedem Schnitt.

Die Quantifizierung des Migrationsmusters von EGFP-Neuronen der MGE ergab in den Kontroll-experimenten die höchste Fluoreszenzintensität für die Region 1, die Ventrikularzone. Die Intensitäten fielen dann bis Segment 4 auf ca. 25 % ab. Ab Region 8 konnten kaum noch Fluoreszenzintensitäten gemessen werden (Abb. 8C; n=8 Schnitte). Die Zellen migrierten somit aus dem MGE-Explantat entlang der Ventrikular- und Subventrikularzone der LGE des Wildtyp-Schnittes in Richtung Cortex, wobei der Bereich des Striatums weitestgehend vermieden wurde (Abb. 8A). Damit entspricht die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten dem typischen Migrationsmuster tangential migrierender corticaler Interneurone im dorsalen Migrationsstrom, mit Ausnahme der hohen Zelldichte in der VZ, welche *in vivo* normalerweise gemieden wird. Diese untypisch starke Migration in der Ventrikularzone wurde bereits von Zimmer et al. (2007) in ähnlichen Experimenten festgestellt und stellt ein *in vitro*-Artefakt dar. Es lässt sich mit einer regionenspezifischen Herunterregulation der Expression von Ephrin-A5 in der VZ von LGE und MGE der *in vitro*-Schnitte erklären. Ephrin-A5 wirkt repulsiv auf

corticale Interneurone, weshalb eine Invasion dieser Region nach der artifiziiellen Abnahme dieses Lenkungsfaktors nicht weiter vermieden werden kann.

Die Analyse des Migrationsmusters Cell Tracker-markierter Zellen im VMS zeigt in den Kontroll-experimenten ein gegensätzliches Bild verglichen mit den VMS-Transplantationsexperimenten. Hier wurden die meisten Neurone in den Segmenten 8-10 gefunden, welche den piriformen Cortex repräsentieren. Richtung VZ wurde die Anzahl gefärbter Zellen immer geringer, wobei bereits in Segment 7 nur noch etwa 12 % der Zellen gezählt wurden. In den Regionen 1-3 konnten kaum noch Zellen gefunden werden (Abb. 8F; n=12 Schnitte). Die Zellen mit Ursprung in der POA wurden durch den Cell Tracker-Farbstoff in der IMZ kurz vor dem Striatum markiert und migrierten entlang des piriformen Cortex in Richtung Neocortex, wobei der Bereich der striatalen Anlage größtenteils vermieden wurde (Abb. 8D). Die Verteilung der Neurone entspricht damit dem typischen Migrationsmuster tangential migrierender corticaler Interneurone im ventralen Migrationsstrom.

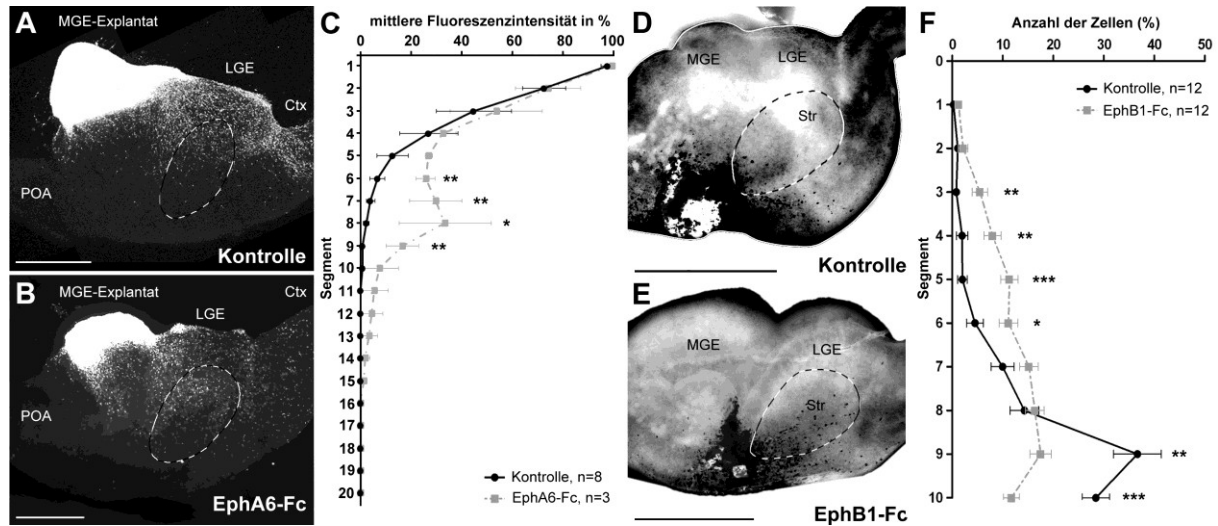
### 4.2.2. Blockieren von Ephrin-Liganden

Um mit dem Eph/Ephrin-System zu interferieren wurden dem Medium in einem Teil der Experimente rekombinante Eph-Rezeptoren zugesetzt, welche endogene Ephrin-Liganden blockieren. Zur Beeinflussung des Ephrin-A-Systems im dorsalen Migrationsstrom wurde EphA6-Fc eingesetzt, das ausschließlich an A-Liganden bindet. Somit wird unter anderem Ephrin-A3 im Striatum blockiert, einem Nicht-Zielgebiet corticaler Interneurone. Für das B-System im ventralen Migrationsstrom wurde EphB1-Fc verwendet, welches nur an B-Liganden bindet. Da Ephrin-B1 nur eine schwache Expression in der POA zeigt und Ephrin-B2 vor allem in der VZ der LGE vorhanden ist (Zimmer et al., 2011), ist somit zu erwarten, dass durch Zugabe von EphB1-Fc in diesem Gebiet hauptsächlich Ephrin-B3 auf den migrierenden Zellen des VMS blockiert wird.

Wie in Abb. 5C zu erkennen ist, veränderte sich nach Zugabe von EphA6-Fc die Verteilung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten. Ähnlich wie in den Kontrollexperimenten wurde zunächst die höchste Fluoreszenzintensität für die Region 1, die Ventrikularzone, gemessen, während die Intensitäten in den weiteren Segmenten Richtung piriformer Cortex abfielen. Jedoch waren die Fluoreszenzintensitäten in den Segmenten 6-9 im Vergleich zu den Kontrollwerten signifikant erhöht (Segmente 6-7 und 9:  $**p<0,01$ ; Segment 8:  $*p<0,05$ ; *one-way ANOVA*; n=3 Schnitte; Abb. 8C). Diese Regionen repräsentieren hauptsächlich die striatale Anlage. Die EGFP-Neurone migrierten somit aus dem MGE-Explantat entlang der Ventrikular- und Subventrikularzone der LGE des Wildtyp-Schnittes in Richtung Cortex, wobei das Blockieren endogener Ephrin-A-Liganden das repulsive Potential des Striatums reduzierte, sodass die Zellen verstärkt in dieses Gebiet einwanderten (Abb. 8B).

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für den ventralen Migrationsstrom nach dem Blockieren von B-Liganden durch Zusatz von EphB1-Fc. Unter Kontrollbedingungen wurden die meisten Cell Tracker markierten Zellen vor allem in den Segmenten 9 und 10 gefunden (Segment 9:  $**p<0,01$ ; Segment 10:  $***p<0,001$ ; *one-way ANOVA*; n=12 Schnitte), jedoch nicht im Striatum. Im Gegensatz dazu konnten in Anwesenheit von EphB1-Fc signifikant mehr markierte Zellen in Segmenten, die der striatalen Anlage entsprechen, detektiert werden (Segmente 3-4:  $**p<0,01$ ; Segment 5:  $***p<0,001$ ; Segment 6:

\* $p < 0,05$ ; *one-way ANOVA*;  $n=12$  Schnitte; Abb. 8F). Damit führte das Blockieren membran-gebundener B-Liganden auf der Oberfläche migrierender Interneurone zu einer Invasion dieser Zellen in das Striatum (Abb. 8E), da sie nicht mehr auf das repulsive EphB1-Signal in diesem Nicht-Zielgebiet reagieren konnten.



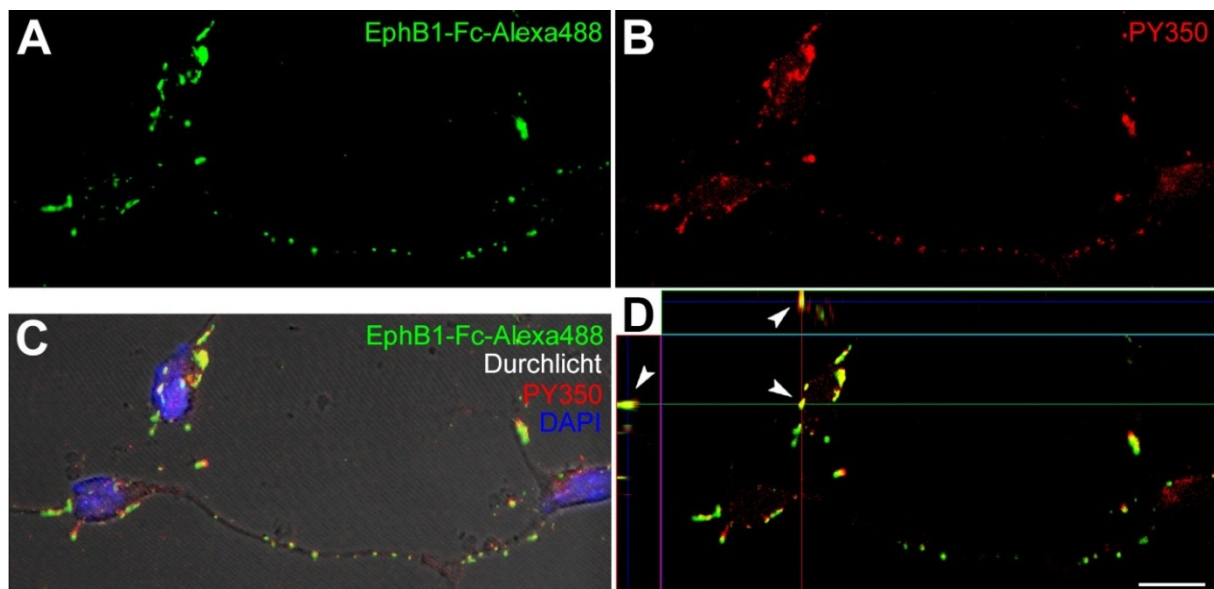
**Abb. 8: Invasion des Striatums nach Blockieren von Ephrin-Liganden in organotypischen Schnittkulturen.** A-C, Untersuchung der tangentialen Migration von EGFP-MGE-Neuronen des dorsalen Migrationsstromes in E14 Wildtypschnitten nach Blockieren der Ephrin-A-Funktion. (A) Transplantierte EGFP-MGE-Zellen migrieren in einem Korridor dorsal des Striatums Richtung Cortex, wobei sie die Mantelzone des Striatums weitestgehend vermeiden. (B) Nachdem endogene Ephrin-A-Liganden mit 5 µg/ml EphA6-Fc blockiert wurden, migrieren vermehrt EGFP-Zellen in das Striatum ein. (C) Quantitative Analyse der relativen Fluoreszenzintensitäten nach 2 DIV über eine Säule in der LGE, welche in 20 Segmente eingeteilt wurde. Dabei repräsentiert das Segment 1 die VZ, die Segmente 2-6 die SVZ und die Segmente 7-13 die striatale Anlage. D-F, Analyse der tangentialen Migration Cell Tracker C2925-markierter Neurone des ventralen Migrationsstromes nach Blockieren der Ephrin-B-Funktion. (D) Gefärbte VMS-Zellen in E14 Gehirnschnitten nach 1 DIV migrieren vor allem im piriformen Cortex Richtung Neocortex und vermeiden dabei unter Kontrollbedingungen den Bereich der striatalen Anlage. (E) Nach Blockierung endogener Ephrin-B-Liganden durch Zugabe von 5 µg/ml EphB1-Fc wandern vermehrt markierte Zellen des VMS in das Striatum ein. (F) Quantifizierung der Verteilung Cell Tracker-markierter Neurone an E14 plus 1 DIV in einem Ausschnitt der LGE, welcher in 10 Segmente unterteilt wurde. Dabei wurden die Segmente 1-4 zu den Proliferativen Zonen (VZ und SVZ) zusammengefasst, die Segmente 5-7 repräsentieren die striatale Anlage und die Segmente 8-10 den piriformen Cortex. Lateral ist rechts und medial ist links. Die gestrichelte Linie markiert den Bereich des Striatums. LGE – laterale ganglionische Eminenz, MGE – mediale ganglionische Eminenz, POA – präoptisches Areal, Str – Striatum.  $n$ =Anzahl ausgewerteter Schnitte. *One-way ANOVA* \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Maßstab: 500 µm.

### 4.3. Das Striatum wirkt repulsiv auf migrierende corticale Interneurone

#### 4.3.1. Wirksames EphB1 *reverse signaling* über Ephrin-B-Liganden

Mittels Ephrin-B3 *in situ* Hybridisierung in Kombination mit EphB1-Fc Bindungsstudien konnte bereits gezeigt werden, dass 79 % der Calbindin-positiven Interneuronenpopulation aus der POA und des ventralen Migrationsstromes Ephrin-B3 Liganden tragen (Zimmer et al., 2011). In dieser Arbeit wurde die EphB1-Fc-Bindung mit einer Immunfärbung gegen Phospho-Tyrosin kombiniert, um zu zeigen, dass ein *reverse signaling* von diesem Rezeptor über B-Liganden möglich ist, welche von den Interneuronen exprimiert werden. Damit könnte der EphB1-Rezeptor die Migration B-Liganden-tragender corticaler Interneurone des VMS beeinflussen. Dafür wurden dissoziierte VMS-Zellen mit EphB1-Fc stimuliert, welches an Alexa488 gekoppelt wurde, um die EphB1-Bindungsstellen sichtbar zu machen. Anschließend wurde eine Immunfärbung gegen Phospho-Tyrosin pY350 durchgeführt,

welches die Aktivierung von Zielproteinen an spezifischen Phosphorylierungsstellen zeigt. Dabei zeigte sich, dass phosphorylierte Tyrosine kolokalisiert mit Alexa488-markiertem EphB1-Fc vorliegen (Abb. 9C). In Abb. 9D ist ein Einzelbild des z-Stapels zu sehen, welches deutlich Kolokalisationen zwischen EphB1-Fc-Bindungsstellen und pY350 zeigt, sichtbar als gelbe Überlappung beider Fluoreszenzsignale. Dies bestätigt, dass Ephrin-B-Liganden durch EphB1 phosphoryliert und damit auch aktiviert wurden, was ein Hinweis auf ein effektives *reverse signaling* ist. Da EphB1-Fc im ventralen Migrationsstrom aufgrund der Expressionsmuster vorwiegend nur an Ephrin-B3-Liganden binden kann, unterstützt dieses Ergebnis die schon aufgrund der komplementären Expressionsmuster von EphB1 und Ephrin-B3 (Abb. 7F) aufgestellte These, dass das im Striatum exprimierte EphB1 repulsiv auf migrierende corticale Interneurone des VMS wirkt, welche Ephrin-B3-Liganden tragen und somit verhindert, dass diese Zellen in dieses Nicht-Zielgebiet einwandern.

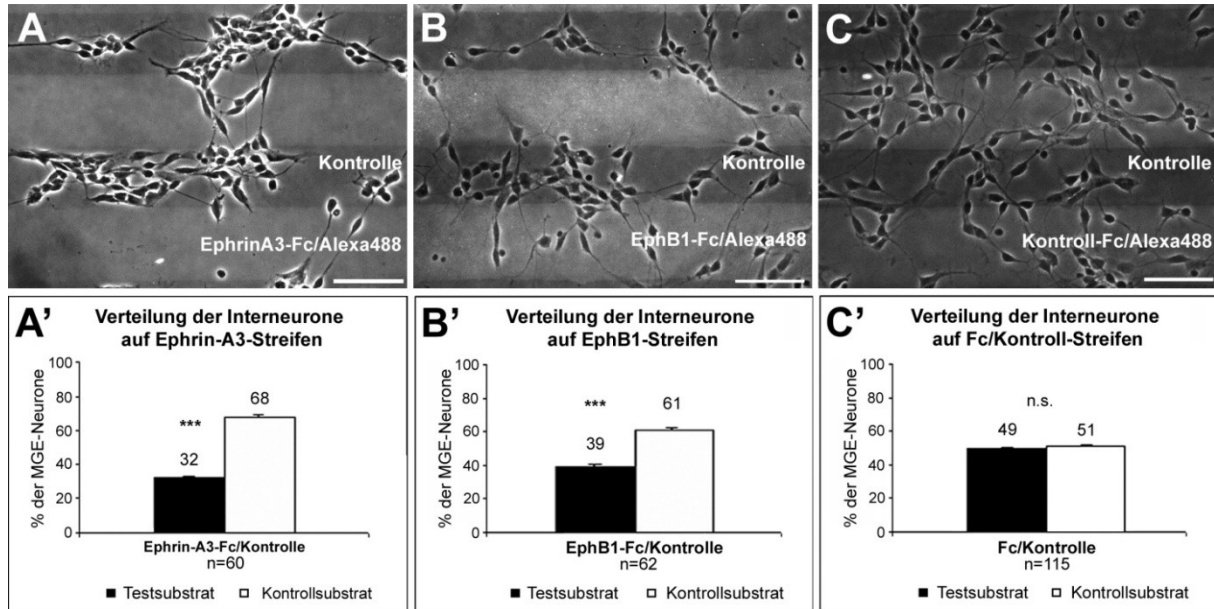


**Abb. 9: Stimulation von MGE-Neuronen mit rekombinantem EphB1-Fc**, welches mit Alexa488 geclustert wurde (**A, C, D**; grün), führt zur Phosphorylierung und dadurch zur Aktivierung von B-Liganden auf den Zellen, wie eine Immunmarkierung gegen Phospho-Tyrosin pY350 zeigt (**B, C, D**; rot). **C**, Überlagerung der pY350-Markierung mit den EphB1-Fc-Bindestellen, der Kernfärbung mit DAPI und der Durchlichtaufnahme. **D**, Die Kolokalisation von pY350 und EphB1-Fc-Alexa488 (Pfeilspitzen) in einem Einzelbild des z-Stapels in orthogonaler Ansicht liefert einen deutlichen Hinweis für ein wirksames Ephrin-B-*reverse signaling*.

#### 4.3.2. Die im Striatum exprimierten Faktoren Ephrin-A3 und EphB1 wirken repulsiv auf corticale Interneurone

Um die Hypothese zu testen, dass die im Striatum exprimierten Faktoren Ephrin-A3 und EphB1 einen lenkenden Einfluss auf migrierende corticale Interneurone haben, wurde ein Streifenassay durchgeführt. Dabei wurden Zellen aus der medialen ganglionischen Eminenz entweder auf alternierenden Streifen von fluoreszenzmarkiertem Ephrin-A3-Fc und unmarkierten Kontrollstreifen kultiviert (Abb. 10A), oder auf alternierenden EphB1-Fc-Streifen (Abb. 10B). Nach 2 DIV zeigten die Neurone in beiden Fällen ein präferentielles Wachstum auf den Kontrollstreifen und vermieden die Ephrin-A3- bzw. EphB1-Streifen. Eine quantitative Analyse ergab, dass Ephrin-A3 eine starke repulsive Wirkung auf die corticalen Interneurone hat, da 68 % der Zellen die Ephrin-A3-haltigen Streifen vermieden und stattdessen auf dem Kontrollsubstrat wuchsen (Abb. 10A'; \*\*\* $p < 0,001$ ;

gepaarter t-Test). Ein ähnlich starker repulsiver Effekt ergab sich für EphB1. Hier vermieden 61 % der Interneurone die Teststreifen (Abb. 10B'; \*\*\* $p < 0,001$ ; gepaarter t-Test). In Kontrollexperimenten mit alternierenden Streifen von fluoreszenzmarkiertem und unmarkiertem Fc-Kontrollprotein (Abb. 10C) zeigten die Zellen dagegen keine Präferenz für ein Substrat (Abb. 10C').



**Abb. 10: Ephrin-A3 und EphB1 haben einen repulsiven Effekt auf corticale Interneurone.** A-C, Dissoziierte Neurone aus der MGE (E14) wurden auf alternierenden Streifen von fluoreszenzmarkiertem Ephrin-A3-Fc (A) oder EphB1-Fc (B) und unmarkierten Kontrollstreifen, bzw. auf Kontrollstreifenfeldern (C) kultiviert. Nach 2 DIV zeigte sich deutlich, dass die Neurone die Ephrin-A3-Fc- und EphB1-Fc-haltigen Streifen vermeiden. A'-C', Quantifizierung der Verteilung der MGE-Zellen im Streifenassay mit Ephrin-A3-Fc (A') oder EphB1-Fc (B') oder Kontrollstreifen (C') nach 2 DIV. \*\*\* $p < 0,001$ ; gepaarter t-Test. n=Anzahl ausgewerteter Bilder. Maßstab 50  $\mu$ m.

#### 4.3.3. Der repulsive Effekt von Ephrin-A3 und EphB1 wird über EphA4 und Ephrin-B3 vermittelt

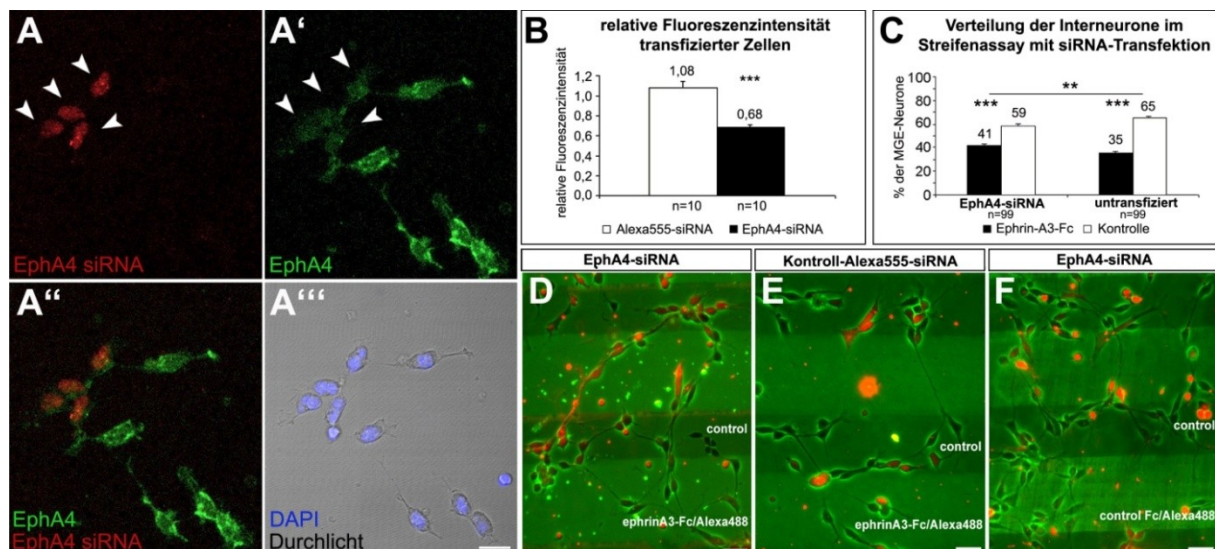
Die komplementären Expressionsmuster sowie die möglichen Bindungspartner für die einzelnen Ephrine (Martinez and Soriano, 2005) legen die Vermutung nahe, dass die repulsive Wirkung von Ephrin-A3 für die Zellen des DMS über EphA4 vermittelt wird, während für den VMS EphB1 über Ephrin-B3 wirkt. Um dies zu bestätigen, wurde die Expression der vermittelnden Rezeptoren bzw. Liganden auf den Interneuronen vorübergehend mittels *small interfering* RNA (siRNA)-Transfektion herunter reguliert. Dafür wurden die MGE-Zellen im Streifenassay mittels Lipofektion mit siRNA gegen EphA4 bzw. Ephrin-B3 transfiziert. Zusätzlich wurde eine fluorensgekoppelte Alexa555-Kontroll-siRNA appliziert, um transfizierte Zellen sichtbar zu machen. Durch diesen experimentellen Ansatz war es möglich, transfizierte Zellen mit unterdrückten EphA4-Rezeptoren bzw. Ephrin-B3-Liganden und untransfizierte Zellen mit normaler Rezeptor- bzw. Liganden-Expression im selben Streifenfeld zu vergleichen.

Die Effizienz des *knockdowns* wurde für die EphA4-siRNA durch Transfektion von MGE-Zellen abgesichert, welche nach 2 DIV gegen EphA4 immunmarkiert wurden. Anschließend wurden am LSM Bilder von den Zellen aufgenommen und die Fluoreszenzintensität des EphA4-Signals gemessen. Die Fluoreszenzintensitäten transfizierter Zellen wurden für jedes Bild relativ zu denen untransfizierter



Zellen berechnet. Dabei zeigte sich, dass die Intensität des EphA4-Signals von Neuronen, die mit siRNA gegen EphA4 transfiziert waren, um 32 % geringer war als das untransfizierter Zellen (Abb. 11A-A''' und B;  $***p<0,001$ ; studentscher t-Test). Somit hatte die siRNA das Expressionslevel von EphA4 deutlich gemindert.

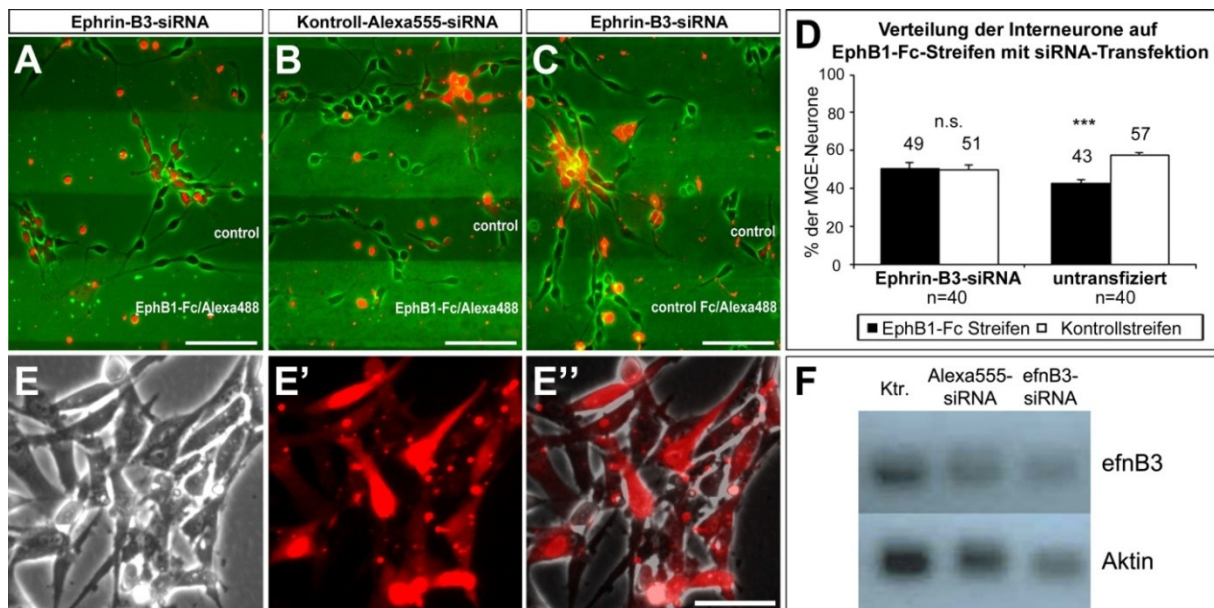
Dementsprechend zeigte sich auch im Streifenassay eine Reduktion des repulsiven Effekts von Ephrin-A3, da transfizierte Zellen (rot) die Ephrin-A3-Fc-Streifen nicht so stark vermieden wie benachbarte untransfizierte Zellen mit normaler EphA4-Expression (Abb. 11C und D;  $**p<0,01$ ; studentscher t-Test). Dieser Effekt ist der Wirkung der EphA4-siRNA zuzuschreiben, da eine Transfektion mit Kontroll-Alexa555-siRNA allein keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellen hatte, da transfizierte sowie untransfizierte Neurone die Ephrin-A3-Fc-Streifen gleich stark vermieden (Abb. 11E). Ebenso hatte der Einsatz von EphA4-siRNA keinerlei Einfluss auf die Verteilung der Interneurone auf Fc-/Kontroll-Streifen (Abb. 11F). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der repulsive Effekt von Ephrin-A3 über EphA4 vermittelt wird.



**Abb. 11: Die Herunterregulation von EphA4 verringert die Repulsion von corticalen Interneuronen durch Ephrin-A3.** **A-B,** Nachweis der Wirksamkeit der EphA4-siRNA durch Fluoreszenzintensitätsmessung einer Immunmarkierung gegen EphA4 an transfizierten MGE-Zellen nach 2 DIV. EphA4-transfizierte Neurone (**A**) zeigen eine schwächere Expression von EphA4 als untransfizierte Zellen (**A'**; Pfeilspitzen). (**A''**) Überlagerung der EphA4-siRNA-Transfektion mit dem EphA4-Signal. (**A'''**) Überlagerung der DAPI-Kernfärbung mit Durchlicht. **B,** Transfektion mit EphA4-siRNA reduziert die Fluoreszenzintensität und damit die Expression von EphA4 verglichen mit Alexa555-Kontroll-siRNA-transfizierten Neuronen. **C,** Quantifizierung der Verteilung von EphA4-siRNA-transfizierten und untransfizierten Neuronen im Ephrin-A3-Fc-Streifenassay nach 2 DIV. **D,** Auf mit EphA4-siRNA transfizierte Neurone (rot) wirken die Ephrin-A3-Fc-Streifen weniger repulsiv als auf untransfizierte Zellen. **E,** Transfektion mit Kontroll-Alexa555-siRNA hatte keinen Einfluss auf die repulsive Wirkung von Ephrin-A3-Fc, ebenso wenig wie EphA4-siRNA die Verteilung der Zellen auf Kontrollstreifen beeinflusste (**F**).  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$ ; Gepaarter t-Test. n=Anzahl ausgewerteter Bilder. Maßstab 10  $\mu$ m.

Für den Nachweis der Effizienz der Ephrin-B3 siRNA konnte das für die EphA4 siRNA angewandte Verfahren der Immunmarkierung transfizierter Neurone nicht genutzt werden, da kein Ephrin-B3-Antikörper verfügbar ist. Daher wurden Ephrin-B3-exprimierende NIH3T3-Fibroblasten verwendet, in denen das Ephrin-B3-Expressionslevel nach Transfektion mit Ephrin-B3-siRNA nach 1 DIV mittels RT-PCR bestimmt wurde. Normalisiert auf die Transfektionsrate und das Aktin-Expressionslevel ergab sich dabei eine Abnahme der Ephrin-B3-Expression von  $53,1 \pm 6,6$  % (n=3 unabhängige Experimente; Abb. 12E-E''; F) im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Fibroblasten.

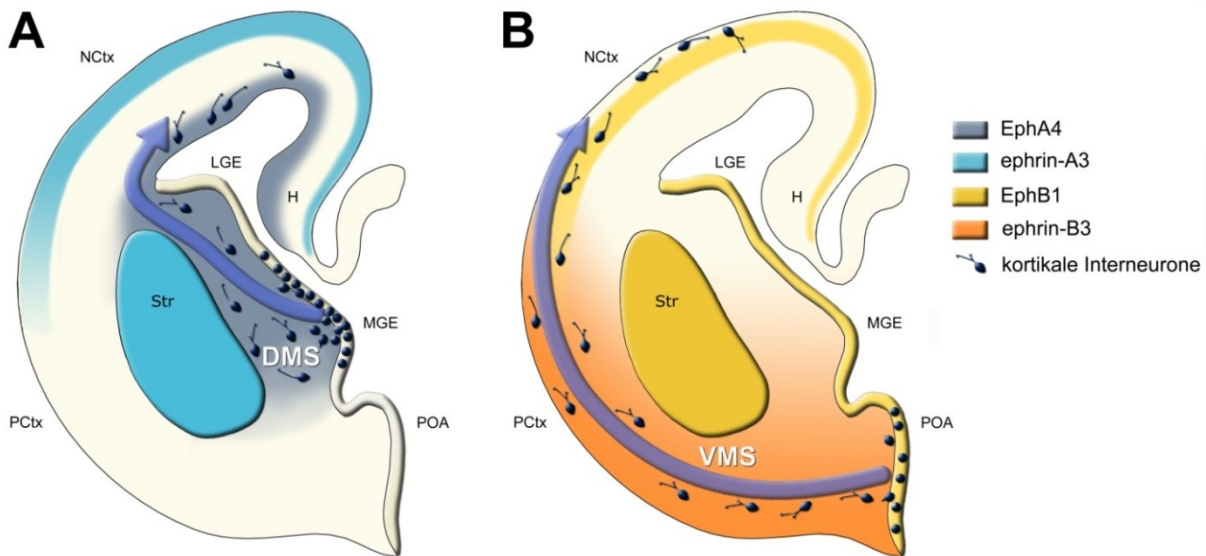
Wie in Abb. 12A und D (links) dargestellt, hob die Herunterregulation der Ephrin-B3-Liganden durch siRNA-Transfektion die repulsive Wirkung von EphB1 vollständig auf, da transfizierte Neurone (rot) keine Präferenz für die Kontrollstreifen mehr zeigten. Im Gegensatz dazu vermied die Mehrzahl der untransfizierten Zellen mit normaler Ephrin-B3-Expression, die EphB1-Fc-haltigen Streifen des gleichen Streifenfeldes (Abb. 12D, rechts; \*\*\* $p < 0,001$ ; studentscher t-Test). Wie auch bei der EphA4-siRNA-Transfektion hatte die Behandlung mit Alexa555-Kontroll-siRNA auf EphB1-Fc-Streifen sowie die Transfektion mit Ephrin-B3-siRNA auf Fc-/Kontroll-Streifen jeweils keinen Effekt auf die Verteilung transfizierter Interneurone im Vergleich zu den entsprechenden Versuchsansätzen ohne siRNA-Transfektion (Abb. 12B und C). Somit lässt sich darauf schließen, dass die EphB1-Repulsion über Ephrin-B3 vermittelt wird.



**Abb. 12: Der repulsive Effekt von EphB1 wird über Ephrin-B3-reverse signaling vermittelt.** A-D, Transfektion von MGE-Zellen im EphB1-Fc-Streifenassay mit Ephrin-B3-siRNA. Nach Herunterregulation der Ephrin-B3-Liganden durch siRNA (rot) war die durch EphB1-Fc induzierte Repulsion im Streifenassay nach 2 DIV aufgehoben, während untransfizierte Zellen die EphB1-Fc weiterhin vermieden (A). Alexa555-markierte Kontroll-siRNA hatte keinen Effekt auf die Verteilung der Zellen, welche die EphB1-Fc-Streifen weiterhin vermieden (B), ebenso wenig wie Transfektion mit Ephrin-B3-siRNA auf Fc-/Kontroll-Streifen (C). D, Quantifizierung der Verteilung von Ephrin-B3-siRNA-transfizierten und untransfizierten Neuronen im EphB1-Fc-Streifenassay nach 2 DIV. E-E'', Ephrin-B3 exprimierende NIH3T3 Fibroblasten (E) wurden mit Ephrin-B3-siRNA und Alexa555-gekoppelter Kontroll-siRNA kotransfiziert (E'). Die Überlagerung der Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme zeigt einen sehr hohen Anteil transfizierter Zellen (E''). F, RT-PCR gegen Ephrin-B3 und Aktin an Ephrin-B3 exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten (Ktr.; 1. Spalte), welche zudem mit Alexa555-Kontroll-siRNA (2. Spalte) oder Ephrin-B3-siRNA (3. Spalte) transfiziert worden waren. Für die Quantifizierung der Expression wurden die Ephrin-B3-Banden gegen Aktin normalisiert und die Transfektionseffizienz mit eingerechnet. Die Transfektion mit Ephrin-B3-siRNA führte zu einer Abnahme der Ephrin-B3-Expression von ca. 53 % in Ephrin-B3 exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten, was jedoch im Blot aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Zellmengen, sichtbar durch das Aktin-Level, mit bloßem Auge nicht erkennbar ist. Gepaarter t-Test; \*\*\* $p < 0,001$ . n=Anzahl ausgewerteter Bilder. Maßstab 50  $\mu$ m.

Dementsprechend bestätigt sich damit die Hypothese, dass die corticalen Interneurone des dorsalen Migrationsstromes mit Ursprung in der MGE das Striatum durch die repulsive Wirkung des dort exprimierten Ephrin-A3 vermeiden, welches sie über ihre EphA4-Rezeptoren detektieren (Abb. 13A). Für die Interneurone aus der POA, die den Cortex über den ventralen Migrationsstrom erreichen, wirkt das Nicht-Zielgebiet Striatum durch das dort ebenfalls vorhandene EphB1 abstoßend,

wobei dieser Effekt über die Ephrin-B3-Liganden auf den migrierenden Zellen vermittelt wird (Abb. 13B).



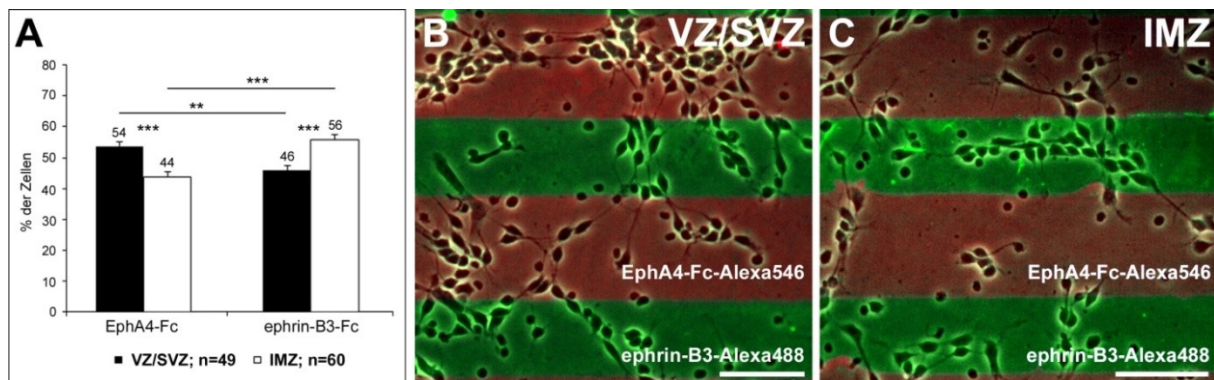
**Abb. 13: Das Striatum wirkt repulsiv auf migrierende corticale Interneurone.** Schematische Darstellung eines coronalen E14-Hirnschnittes der linken Hemisphäre. Ephrin-A3 und EphB1 werden beide in der striatalen Anlage exprimiert, und kanalisieren corticale Interneurone auf ihrem Weg zum Cortex. Dabei vermeiden MGE-geborene Neurone des dorsalen Migrationsstromes das Striatum über repulsive Ephrin-A3-EphA4-Wechselwirkungen (A) und Neurone des ventralen Migrationsweges mit Ursprung in der POA über EphB1-induziertes Ephrin-B3-*reverse signaling* (B). Medial ist rechts und dorsal ist oben. DMS – dorsaler Migrationsstrom, H – Hippocampus, LGE – laterale ganglionische Eminenz, MGE – mediale ganglionische Eminenz, NCtx – Neocortex, PCtx – piriformer Cortex, POA – präoptisches Areal, Str – Striatum, VMS – ventraler Migrationsstrom.

#### 4.4. Die Segregation in den dorsalen und ventralen Migrationsstrom erfolgt über bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-signaling

Die oben beschriebene komplementäre Expression von EphA4 und Ephrin-B3 im dorsalen und ventralen Migrationsweg corticaler Interneurone aus der MGE und POA (Abb. 7A, D) lässt auf eine Beteiligung an der räumlichen Trennung dieser beiden Migrationsströme schließen. Interneurone mit Ursprung in der MGE exprimieren EphA4 und migrieren entlang des dorsalen Weges, während Interneurone aus der POA Ephrin-B3 exprimieren und die ventrale Route nehmen. Ausgehend von Expressionsdaten und möglichen Bindungspartnern wurden Liganden gesucht, welche die Interneurontypen in ihren jeweiligen Bahnen halten würden. Dabei zeigte sich, dass Ephrin-B3 den passendsten Liganden für repulsives EphA4-*forward signaling* darstellt, welches dorsal migrierende Interneurone begrenzt. Umgekehrt scheint EphA4 der geeignetste Ligand für repulsives *reverse signaling* über Ephrin-B3 in ventral migrierenden Interneuronen zu sein (Zimmer et al., 2011). Somit würden beide Interneurontypen durch EphA4-/Ephrin-B3-Bindung aktiviert werden, wodurch bidirektionales *signaling* ausgelöst würde. Bindungsstudien sind kompatibel mit dieser Hypothese, da sich zeigte, dass EphA4-Rezeptoren auf MGE-Interneuronen durch rekombinantes Ephrin-B3-Fc aktiviert werden können. Ebenso konnten umgekehrt Ephrin-B3-Liganden auf POA-Interneuronen durch EphA4-Fc aktiviert werden (Zimmer et al., 2011).

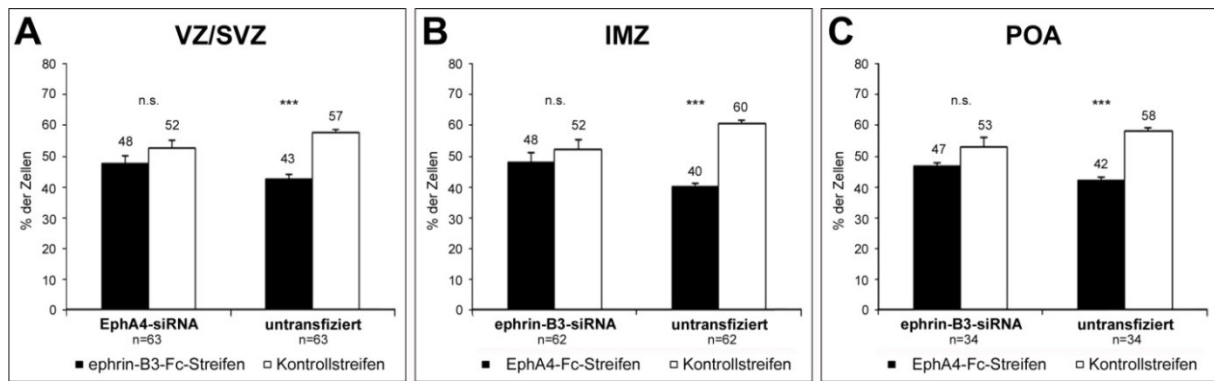


Um die mögliche Wirkung von EphA4 und Ephrin-B3 als Liganden für bidirektionales *signaling* auf Interneuronen beider Migrationsströme funktionell zu testen, wurden Doppelstreifenexperimente durchgeführt. Dabei wurden für den DMS Zellen aus der VZ/SVZ und für den VMS Einzelzellen aus der IMZ der MGE jeweils auf alternierenden EphA4-Fc- und Ephrin-B3-Fc-Streifen kultiviert. Im Gegensatz zu den Einzelstreifenexperimenten war hier also kein Kontrollsubstrat vorhanden, sondern die Zellen hatten die Wahl zwischen EphA4-Fc- und Ephrin-B3-Fc-Streifen. Nach 2 DIV zeigte sich, dass Zellen aus der VZ/SVZ bevorzugt auf den EphA4-Fc-Streifen wuchsen und somit die Ephrin-B3-Fc-Bahnen vermieden (Abb. 14A, B;  $**p<0,01$ ; studentscher t-Test). Umgekehrt hatte EphA4 eine repulsive Wirkung auf Zellen aus der IMZ der MGE, weshalb diese überwiegend auf den Ephrin-B3-Fc-Streifen wuchsen (Abb. 14 A, C;  $***p<0,001$ ; studentscher t-Test).



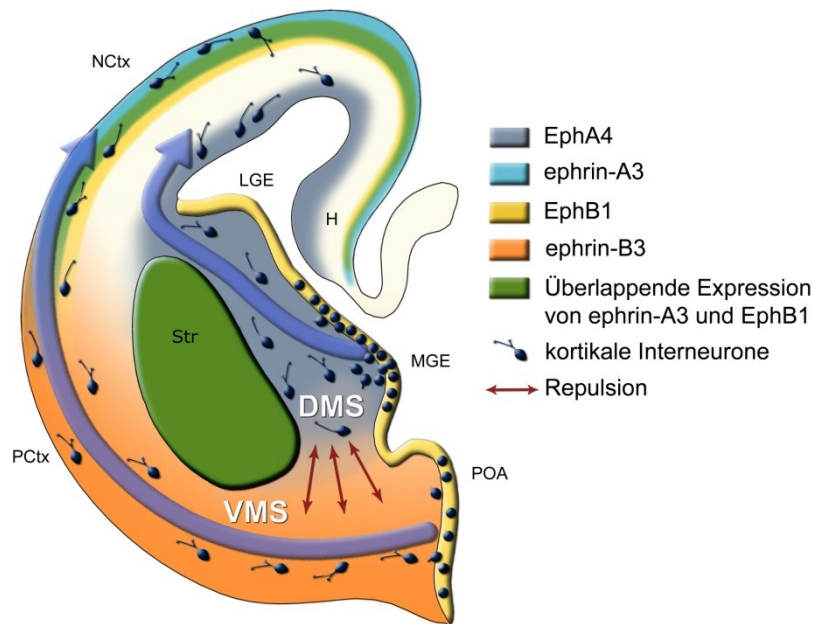
**Abb. 14: Ephrin-B3 wirkt repulsiv auf Neurone des dorsalen Migrationsstromes und EphA4 repulsiv auf Neurone des ventralen Migrationsstromes.** (A) Quantitative Analyse der Verteilung von Zellen aus der VZ/SVZ (schwarze Balken) und aus der IMZ der MGE (weiße Balken) im Doppelstreifenexperiment mit alternierenden Ephrin-B3-Fc- und EphA4-Fc-Streifen. Neurone aus der VZ/SVZ der MGE vermeiden nach 2 DIV die Ephrin-B3-Fc-haltigen Streifen und wachsen bevorzugt auf EphA4-Fc (A, B), während Neurone aus der IMZ umgekehrt die Ephrin-B3-Fc-haltigen Streifen bevorzugten (A, C).  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$ ; Gepaarter t-Test. n=Anzahl ausgewerteter Bilder. Maßstab 50  $\mu$ m.

Um zu überprüfen, ob die repulsive Wirkung von Ephrin-B3 auf dorsal migrierende Interneurone über EphA4 vermittelt wird, wurden Zellen der VZ/SVZ mit siRNA gegen EphA4 transfiziert und auf alternierenden Ephrin-B3-Fc- und Kontrollstreifen kultiviert. Nach 2 DIV wirkte Ephrin-B3 für untransfizierte DMS-Zellen wie schon im Doppelstreifenexperiment repulsiv, während diese Repulsion für EphA4-siRNA-transfizierte Zellen aufgehoben war. Nach dem *knockdown* der EphA4-Rezeptoren waren diese Zellen auf den Ephrin-B3-Fc- und Kontrollstreifen gleichverteilt (Abb. 15A), was die Hypothese unterstützt, dass die Ephrin-B3 induzierte Repulsion von MGE-Interneuronen über EphA4-*forward signaling* vermittelt wird. Umgekehrt wurden Zellen aus dem ventralen Migrationsstrom, welche aus der IMZ sowie aus der POA präpariert wurden, mit Ephrin-B3-siRNA transfiziert und 2 DIV auf alternierenden EphA4-Fc- und Kontrollstreifen kultiviert. Auch hier wuchsen in beiden Fällen untransfizierte VMS-Neurone bevorzugt auf den Kontrollstreifen und vermieden wie schon im Doppelstreifenexperiment die EphA4-Fc-Bahnen. Eine Herunterregulation der Ephrin-B3-Liganden hob dagegen die repulsive Wirkung von EphA4 auf, da transfizierte Zellen keine Präferenz für einen Typ Streifen zeigten (Abb. 15B, C). Dies deutet darauf hin, dass der repulsive Effekt von EphA4 auf Neurone des ventralen Migrationsweges über Ephrin-B3-*reverse signaling* vermittelt wird.



**Abb. 15: Die repulsive Wirkung von Ephrin-B3 auf Neurone des dorsalen Migrationsstromes und von EphA4 auf Neurone des ventralen Migrationsstromes wird durch bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-signaling vermittelt.** Quantitative Analyse der Verteilung von Zellen aus der VZ/SVZ (A) und aus der IMZ der MGE (B), sowie aus der POA (C) im Streifenassay mit siRNA-Transfektion nach 2 DIV. A, Nach Herunterregulation von EphA4 durch siRNA-Transfektion war die repulsive Wirkung der Ephrin-B3-Fc-Streifen auf Zellen des dorsalen Migrationsweges aus der VZ/SVZ aufgehoben. B, C, Die repulsive Wirkung von EphA4-Fc auf Zellen des ventralen Migrationsweges wird durch Ephrin-B3 vermittelt und ist daher nach Transfektion mit Ephrin-B3-siRNA aufgehoben. \*\*\* $p < 0,001$ ; Gepaarter t-Test. n=Anzahl ausgewerteter Bilder.

Somit ergibt sich zusammenfassend folgendes Bild für migrierende corticale Interneurone (Abb. 16): corticale Interneurone, die in der MGE geboren werden, wandern auf einem dorsalen Migrationsstrom Richtung Neocortex, welcher durch repulsive Lenkungsfaktoren nach dorsal und ventral begrenzt ist. Dorsal in der Ventrikularzone werden sowohl EphB1 als auch Ephrin-A5 (Zimmer et al., 2007) exprimiert, die beide eine repulsive Wirkung auf corticale Interneurone haben. Ventral des DMS liegt das Nicht-Zielgebiet Striatum, welches die Zellen durch das dort exprimierte repulsive Ephrin-A3 vermeiden, was über EphA4-forward signaling vermittelt wird. Corticale Interneurone mit Ursprung in der POA migrieren über den ventralen Migrationsstrom Richtung Cortex. Diese Zellen vermeiden das Striatum durch das dort ebenfalls exprimierte EphB1, was über Ephrin-B3-reverse signaling vermittelt wird. In der Übergangszone zwischen beiden Migrationswegen, in der die Zellen miteinander in Kontakt kommen, sorgt repulsives bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-signaling für eine räumliche Trennung der beiden Migrationsströme. Dabei wirkt das auf den DMS-Zellen exprimierte EphA4 über Ephrin-B3-reverse signaling repulsiv für Interneurone aus der POA, während die Ephrin-B3-Liganden dieser VMS-Neurone eine repulsive Antwort in den MGE-Interneuronen auslösen, vermittelt über EphA4-forward signaling. Somit haben EphA4 bzw. Ephrin-B3 auf den Zellen zusätzlich zu ihrer Rezeptorfunktion für den jeweiligen Zelltyp auch jeweils eine repulsive Wirkung als Lenkungsfaktor für den jeweils anderen Zelltyp.



**Abb. 16: Die Segregation in den dorsalen und ventralen Migrationsstrom sowie die Vermeidung des Striatums werden über EphA4 und Ephrin-B3 vermittelt.** Schematische Darstellung eines coronalen E14-Hirnschnittes der linken Hemisphäre. Ephrin-A3 und EphB1 zeigen eine überlappende Expression in der striatalen Anlage. Ihre repulsive Wirkung auf corticale Interneurone verhindert deren Eindringen in das Striatum und kanalisiert diese Zellen auf ihrem Weg zum Cortex. Dies wird für MGE-geborene DMS-Neurone durch Ephrin-A3-EphA4-Wechselwirkungen vermittelt und für VMS-Neurone aus der POA über EphB1-induziertes Ephrin-B3-reverse signaling. In der Übergangszone zwischen beiden Migrationswegen führt repulsives bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-signaling zu einer Segregation der beiden Migrationsströme. Medial ist rechts und dorsal ist oben. DMS – dorsaler Migrationsstrom, H – Hippocampus, LGE – laterale ganglionische Eminenz, MGE – mediale ganglionische Eminenz, NCTx – Neocortex, PCTx – piriformer Cortex, POA – präoptisches Areal, Str – Striatum, VMS – ventraler Migrationsstrom.

#### 4.5. Striatale Neurone werden in ihrem Zielgebiet durch EphB1 gestoppt

Während der gleichen Entwicklungsstadien, in denen corticale Interneurone in der MGE und der POA des basalen Telencephalons geboren werden und ihre Reise in den Cortex antreten, werden auch striatale Neurone in der POA generiert. Diese migrieren tangential in das sich entwickelnde Striatum, welches die corticalen Interneurone vermeiden. Somit stellt sich die Frage, welche zellulären und molekularen Strategien es diesen Zellen erlauben, in die striatale Anlage einzudringen, während die corticalen Interneurone dieses umgehen.

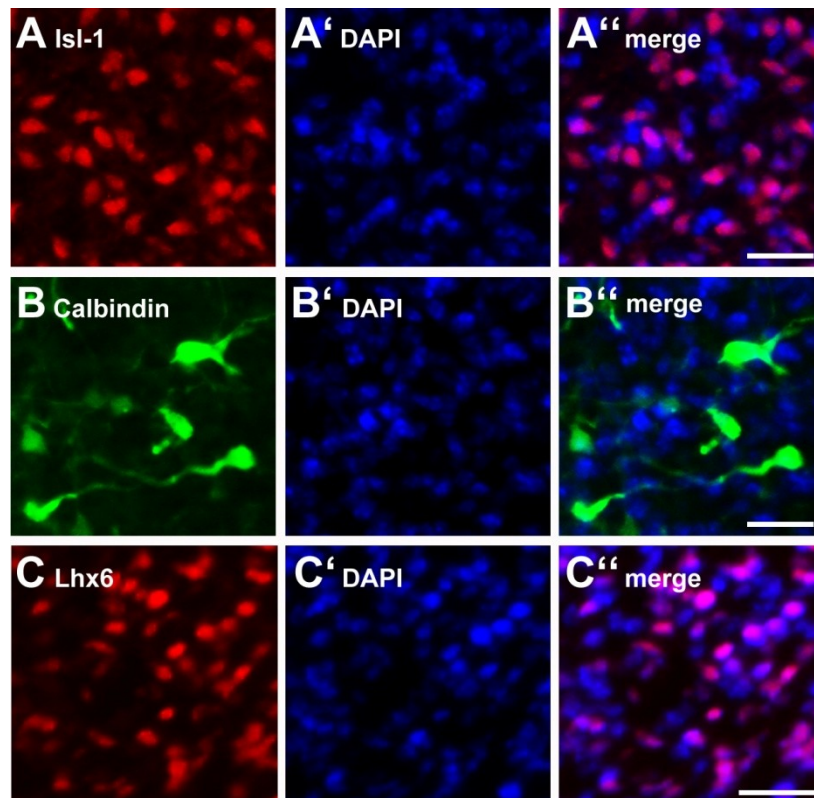
##### 4.5.1. Corticale und striatale Interneurone stellen zwei distinkte Populationen tangential migrierender Zellen dar

Als ersten Schritt zur Charakterisierung der migrierenden striatalen Neurone wurden Immunfluoreszenzfärbungen coronaler E14 Hirnschnitte angefertigt, bei denen ein Antikörper gegen den LIM-Homöodomänen Transkriptionsfaktor Islet-1 (Isl-1), einem Marker für striatale Zellen, benutzt wurde. Proteine mit einer Homöodomäne können mit dieser an DNA binden und stellen daher häufig Transkriptionsfaktoren dar. Sie werden durch eine charakteristische Gensequenz, die Homöobox, codiert und zu dieser zusammengefasst, da sie typischerweise eine ganze Kaskade anderer funktionell zusammenhängender Gene an- und abschalten. Bei Isl-1 stellt diese LIM-Homöodomäne

eine cysteinreiche doppelte Zinkfingerdomäne dar, welche zu dessen Namen mit beitrug. „LIM“ ist ein Akronym für drei Proteine mit solch einer Zinkfinger-Homöodomäne, Lin-11 und Mec-3 aus *Caenorhabditis elegans*, sowie dem Säuger-Transkriptionsfaktor Isl-1, die durch Sequenzhomologien identifiziert wurden (Way and Chalfie, 1988, Freyd et al., 1990, Karlsson et al., 1990).

Während der frühen Entwicklung wird Isl-1 von allen striatalen Vorläuferzellen exprimiert. Darunter fallen sowohl GABAerge Projektions- und Interneurone, als auch cholinerge striatale Interneurone. Später, wenn die Differenzierung weiter fortschreitet, wird die Isl-1-Expression allmählich in nicht-cholinergen Zellen unterdrückt und daher auf cholinerge Neurone beschränkt (Wang and Liu, 2001), welche im adulten Stadium dann nur noch etwa 1 % aller striatalen Neurone ausmachen (Tepper et al., 2010). Laut Literaturangaben werden dabei striatale Projektionsneurone in der Ventrikularzone der LGE geboren und migrieren radial in das Striatum ein (Deacon et al., 1994, Olsson et al., 1995, Anderson et al., 1997, Olsson et al., 1998, Marin et al., 2000), was in Abb. 18A durch vereinzelte Isl-1<sup>+</sup> Zellen in der LGE zu erkennen ist. Striatale Interneurone haben ihren Ursprung dagegen in der MGE und der POA, von wo aus sie tangential in die striatale Anlage einwandern (Marin et al., 2000, Marin and Rubenstein, 2001, Pauly et al., 2012). Dabei zeigte sich in der Isl-1-Immunfärbung, dass der Großteil der Isl-1<sup>+</sup> Neurone der POA entstammt. In der MGE waren dagegen nur wenige Isl-1-markierte Zellen zu finden (Abb. 18A). Eine Quantifizierung ergab, dass etwa 40 % der POA-Zellen Isl-1 exprimieren.

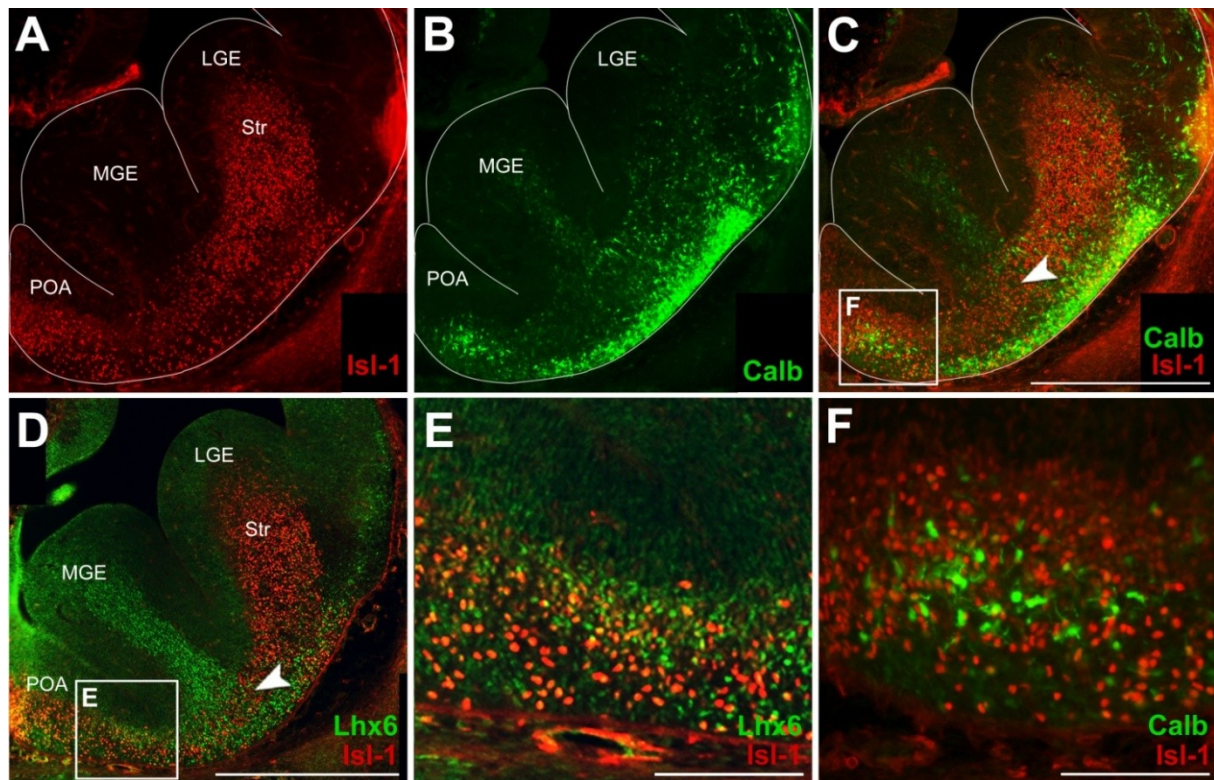
Um den Migrationsweg corticaler Interneurone darzustellen, wurden an coronalen E14 Hirnschnitten Immunfluoreszenzfärbungen gegen die Interneuronenmarker Lhx6 und Calbindin (Anderson et al., 1997, Lavdas et al., 1999, Polleux et al., 2002, Ang et al., 2003, Fogarty et al., 2007, Faux et al., 2010) durchgeführt. Dabei wurden Calbindin<sup>+</sup> Zellen in beiden Migrationsströmen im basalen Telencephalon gefunden: In der SVZ der ganglionischen Eminenzen, welche den Korridor der dorsalen Route repräsentiert, sowie in der POA, der Intermediärzone (IMZ) der MGE und dem piriformen Cortex, welche Teil des ventralen Migrationsweges von Interneuronen aus der POA sind (Abb. 18B). Das Kalziumbindende Protein Calbindin ist im Gegensatz zu dem Transkriptionsfaktor Isl-1 in der gesamten Zelle zu finden, weshalb sich im Schnitt teilweise gut einzelne Zellen mitsamt ihrem *leading*-Fortsatz erkennen ließen (Abb. 17B). Calbindin gefärbte Neurone zeigten dabei keine Koexpression mit Isl-1, wie in dem vergrößerten Ausschnitt in Abb. 18F zu sehen ist. Dies zeigt deutlich, dass es sich, obwohl beide Zellarten in der POA entstehen, um zwei distinkte Zellpopulationen handelt.



**Abb. 17: Immunfärbung striataler und corticaler Interneurone in Kryostatschnitten des basalen Telencephalons** gegen Isl-1 (A), Calbindin (B) und Lhx6 (C). A'-C', DAPI-Kernfärbung. Isl-1 und Lhx6 sind als Transkriptionsfaktoren nur im Nukleus der Neurone zu finden, während Calbindin im Zytoplasma lokalisiert ist. Dies lässt sich jeweils gut in der Überlagerung mit der DAPI-Färbung erkennen (A''-C''). Maßstab: 20  $\mu$ m

Wie Calbindin fanden sich auch Lhx6-positive Neurone im Bereich beider Migrationswege im basalen Telencephalon. Deutlich war dabei eine starke Färbung in der SVZ der MGE auszumachen, welche sich nach ventral in die IMZ der MGE ausbreitete. Zusätzlich fanden sich angefärbte Zellen in der POA, sowie im Bereich des dorsalen und ventralen Migrationsstromes um das Striatum herum, die in den Cortex mündeten, wobei dabei die Markierung im VMS deutlicher zu erkennen war (Abb. 18D). Diese Immunmarkierung stimmt gut mit bereits veröffentlichten Expressionsmustern von Lhx6 überein, in denen *in situ* Hybridisierungen ebenfalls eine starke Expression in der SVZ und IMZ der MGE zeigen, sowie in der POA. Das Signal trennt sich dann entlang des dorsalen und ventralen Migrationsweges corticaler Interneurone Richtung Cortex auf und färbt in diesem den Migrationsstrom in der MZ sowie den in der IZ/SVZ an (Liodis et al., 2007). Lhx6 gehört wie Isl-1 zu den LIM-Homöodomänen Transkriptionsfaktoren, weshalb die Immunmarkierung nicht wie bei Calbindin die gesamte Zelle anfärbt, sondern nur den Zellkern (Abb. 17C). Genauso wie bei Calbindin gibt es jedoch auch bei Lhx6 keine Überlappung mit dem Isl-1-Signal (Abb. 18E). Demnach stellen striatale Isl-1<sup>+</sup> Neurone und corticale Interneurone aus der POA, charakterisiert durch Calbindin und Lhx6, zwei distinkte Zellpopulationen dar. Auf dem Weg zu ihrem Zielgewebe trennen sich die Neurone mit Ursprung in der POA in zwei separate Ströme auf, einen mit dem Ziel Striatum und einen in Richtung Cortex. Die für den Cortex bestimmten Interneurone bilden dabei den VMS und migrieren größtenteils superfiziell in der IMZ entlang des äußersten Randes des basalen Telencephalons, während Isl-1<sup>+</sup> Zellen auf einem separaten Weg tiefer in der IMZ in Richtung Striatum wandern (Abb. 18C, D, Pfeilspitzen).





**Abb. 18: Migrationswege striataler und corticaler Interneurone im basalen Telencephalon.** A-C, Doppelimmunmarkierung gegen Isl-1 (A) und Calbindin (B) an einem E14 Coronalchnitt. Die Überlagerung beider Signale (C) zeigt, dass es keine Koexpression beider Proteine gibt (F) und dass Isl-1<sup>+</sup> striatale Zellen als schmales Band in der Übergangszone (C, Pfeilspitze) zwischen dem dorsalen und ventralen Migrationsstrom corticaler Interneurone migrieren. Diese Zone ist in (B) durch eine geringere Calbindin-Dichte erkennbar. D, E, Die Doppelimmunmarkierung von Isl-1 und Lhx6 an einem E14 Coronalchnitt (D) zeigt ebenfalls keine Koexpression von Isl-1 und dem Interneuronenmarker Lhx6 (E). Maßstab: A-D, 500 µm; E-F, 100 µm.

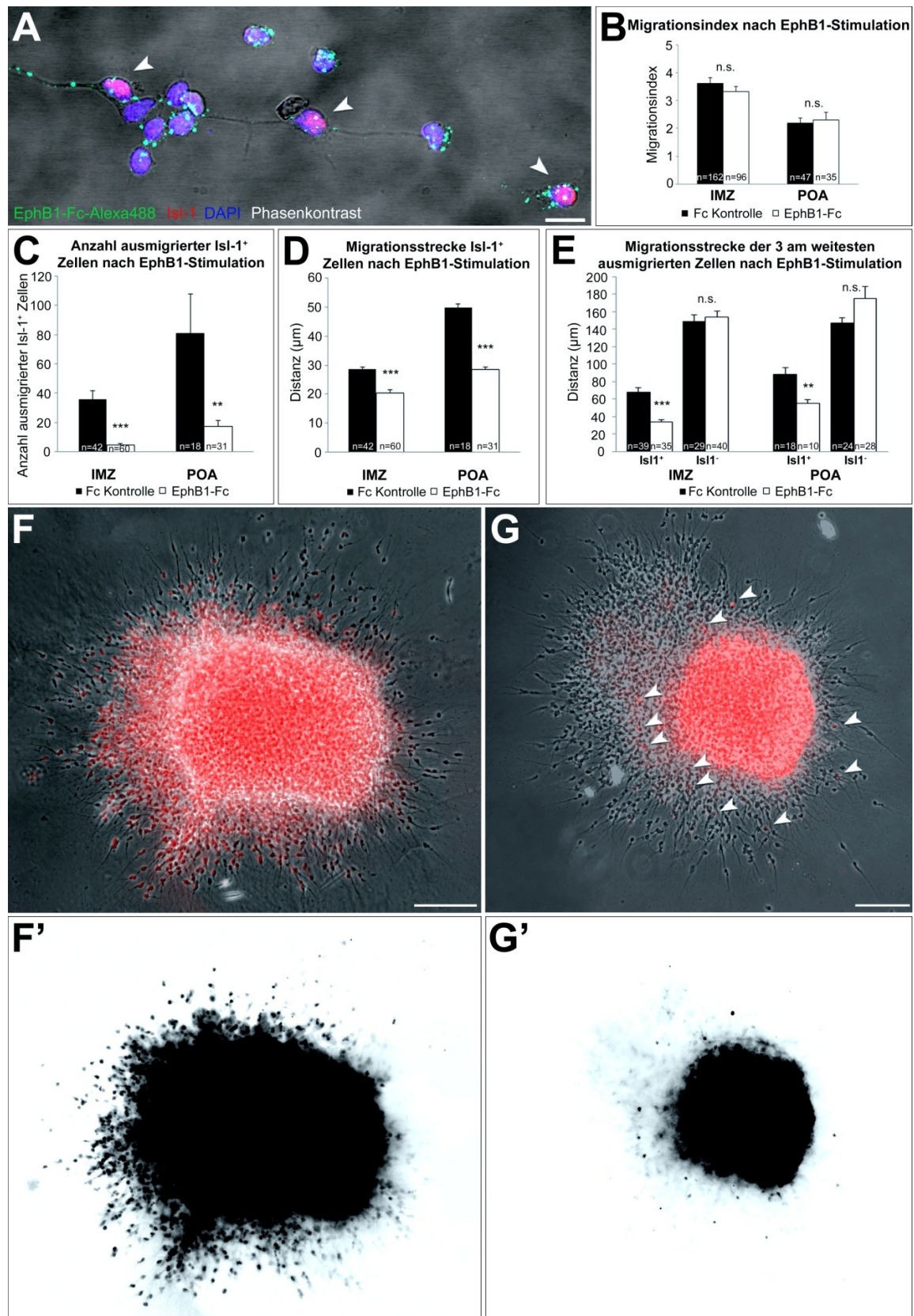
#### 4.5.2. EphB1 wirkt für striatale Neurone als Stopp-Signal

Da sowohl corticale als auch striatale Neurone in derselben Region während derselben Entwicklungsstadien geboren werden, stellt sich die Frage, wie das Striatum als Ziel für die eine Zellpopulation dienen kann, während es zur gleichen Zeit eine Nicht-Zielregion für die andere Zellpopulation darstellt. Zweifellos gibt es mehrere Möglichkeiten, wie das Striatum ein Ausschlussgebiet für corticale Interneurone und gleichzeitig ein Zielgebiet für striatale Zellen sein kann. Aus diesem Grund wurde zuerst die naheliegende Hypothese geprüft, ob die Zellen, die für das Striatum bestimmt sind, einfach keine B-Liganden exprimieren und deshalb das repulsive Eph-B1-Signal im Striatum nicht detektieren. Dafür wurde ein Bindungsassay durchgeführt, bei dem Zellen aus der IMZ mit rekombinantem EphB1-Fc, gekoppelt an Alexa488, stimuliert wurden. Eine Quantifizierung ergab, dass fast alle Isl-1<sup>+</sup> Neurone fluoreszenzgekoppeltes EphB1-Fc gebunden hatten und somit B-Liganden besitzen (93,4 %; Abb. 19A). Anschließend wurde geprüft, ob striatale Neurone möglicherweise ihre B-Liganden herunter regulieren, bevor sie in das Striatum einwandern, während corticale Interneurone ihre B-Liganden behalten und daher das EphB1-exprimierende Striatum umgehen. Um diese Frage zu beantworten, wurde der EphB1-Fc-Bindungsassay mit Zellen, die direkt aus dem Striatum präpariert worden waren, wiederholt. Dabei zeigte sich, dass fast der gleiche Anteil Isl-1<sup>+</sup> Neurone fluoreszenzgekoppeltes EphB1-Fc gebunden hatte wie im ventralen Migrationsstrom (86,6 %). Da Ephrin-B1 in der POA nur sehr schwach exprimiert wird und Ephrin-B2 hauptsächlich in

der VZ der LGE zu finden ist (Zimmer et al., 2011), lassen diese Befunde darauf schließen, dass die EphB1-Bindungsstellen auf Isl-1-exprimierenden striatalen Zellen überwiegend auf Ephrin-B3-Liganden zurückzuführen sind, welche striatale Neurone auch nach dem Eintritt in ihr Zielgebiet noch tragen.

Als nächster Schritt wurde ein Migrationsassay durchgeführt, um den Effekt der EphB1-Stimulation auf die zwei unterschiedlichen Zellpopulationen, bestimmt für den Cortex bzw. das Striatum, zu untersuchen. Dafür wurden Explantate aus der POA oder der IMZ in einem Koagulat aus Hühnerplasma kultiviert, wodurch die Zellen in einem dreidimensionalen Substrat migrieren konnten. Nach 20 Stunden in Kultur, nachdem die Zellen angefangen hatten aus den Explantaten auszumigrieren, wurde dem Medium in einigen Fällen EphB1-Fc zugegeben. Nach 2 DIV wurden die Kulturen fixiert und eine Immunmarkierung gegen Isl-1 durchgeführt, um striatale Zellen zu identifizieren.

Die Stimulation mit EphB1-Fc hatte keinen Einfluss auf das allgemeine Auswachsen der Explantate, da der Migrationsindex von Kontroll- und EphB1-Fc-behandelten Explantaten gleich war. Dies traf sowohl für Explantate aus der IMZ als auch für solche aus der POA zu (Abb. 19B). Betrachtete man jedoch nur die Isl-1<sup>+</sup> Zellen, ergab sich, dass nur sehr wenige Isl-1-exprimierende Neurone die Explantate verließen und die wenigen, die auswanderten, weitaus kürzere Strecken migrierten als Isl-1<sup>-</sup> Zellen. Unter Kontrollbedingungen verließen im Mittel  $36 \pm 6$  Isl-1<sup>+</sup> Zellen Explantate aus der IMZ, während nur  $5 \pm 1$  Isl-1<sup>+</sup> Zellen das Gewebe nach Zugabe von EphB1-Fc verließen (Abb. 19C). Bisweilen migrierten sogar nur Isl-1-negative corticale Interneurone aus dem Gewebe aus, jedoch keine Isl-1-positiven striatalen Zellen. In diesen Fällen konnte die Isl-1-Markierung nur innerhalb der Explantate nachgewiesen werden. Auch dies zeigte wieder, dass EphB1 die Migration striataler Zellen reduziert: unter Kontrollbedingungen migrierten aus 93 % der Explantate Isl-1<sup>+</sup> Zellen aus, während nach Behandlung mit EphB1-Fc Isl-1<sup>+</sup> Zellen nur 58 % der Explantate verließen. Zudem migrierten die wenigen Zellen, die die IMZ-Explantate verließen, in Gegenwart von EphB1-Fc nur  $20 \pm 1,1 \mu\text{m}$  weit ( $n=60$  Explantate; 5 Experimente), im Gegensatz zu  $29 \pm 0,7 \mu\text{m}$  unter Kontrollbedingungen ( $n=42$  Explantate; 5 Experimente;  $***p<0,001$ ; studentscher t-Test; Abb. 19D). Der Effekt der EphB1-Stimulation trat sogar noch deutlicher hervor, wenn die Analyse auf die drei Zellen beschränkt wurde, welche die weiteste Strecke zurückgelegt hatten. Die Zugabe von EphB1-Fc reduzierte dabei den Migrationsweg Isl-1-positiver Zellen um die Hälfte, von  $68 \pm 4,4 \mu\text{m}$  in Kontroll-experimenten ( $n=39$  Explantate; 5 Experimente) auf  $34 \pm 2,4 \mu\text{m}$  ( $n=35$  Explantate; 5 Experimente) mit EphB1-Fc-Stimulation ( $***p<0,001$ ; studentscher t-Test). Im Gegensatz dazu gab es keinen Unterschied in der Wegstrecke, die Isl-1-negative Zellen mit oder ohne EphB1-Behandlung zurücklegten ( $149 \pm 7,7 \mu\text{m}$  mit Fc;  $n=29$  Explantate und  $154 \pm 6,8 \mu\text{m}$  mit EphB1-Fc;  $n=40$  Explantate; Abb. 19E).



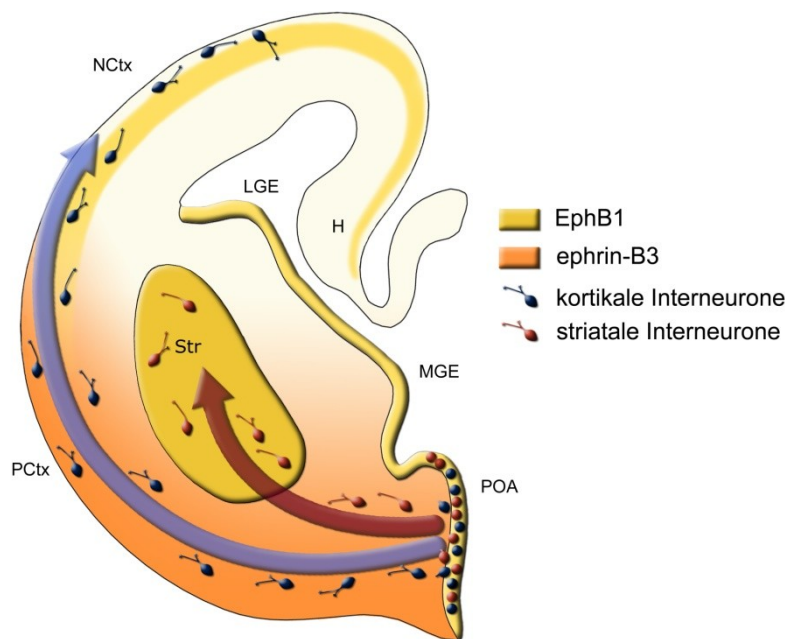
**Abb. 19: EphB1 wirkt für striatale Neurone als Stopp-Signal.** **A**, Rekombinantes Alexa488-gekoppeltes EphB1-Fc bindet sowohl an Isl-1-positive als auch -negative dissoziierte Neurone aus der IMZ. **B-E**, Quantitative Analyse des Migrationsindex (B), der Anzahl (C) und der Migrationsstrecke (D) migrierender Isl-1<sup>+</sup> Neurone, sowie die Distanz der drei am weitesten ausmigrierten Zellen (E) von IMZ- und POA-Explantaten unter Kontrollbedingungen (schwarze Balken), sowie nach Zugabe von rekombinantem EphB1-Fc (weiße Balken). Nach Behandlung mit EphB1-Fc verließen weniger Isl-1<sup>+</sup> Zellen die Explantate (C) und migrierten kürzere Strecken (D, E), während sich der allgemeine Migrationsindex (B) und die Migrationsstrecke Isl-1<sup>-</sup> Zellen



(E) nicht veränderte. F, G, Überlagerung von Phasenkontrast-Aufnahme und Isl-1-Immunmarkierung von Explantaten aus der POA mit (F) und ohne (G) Zugabe von EphB1-Fc. F', G', Die Photokonvertierung der Isl-1-Färbung der Explantate aus F und G veranschaulicht deutlich die reduzierte Anzahl und Distanz ausmigrierter Isl-1<sup>+</sup> Zellen (Pfeilspitzen) nach Behandlung mit EphB1-Fc (G'). \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 Studentscher t-Test. n=Anzahl der Explantate. Maßstab: A, 10 µm; F, G, 100 µm.

Ähnliche Resultate ergaben sich für Explantate aus der POA. Unter Kontrollbedingungen wurden bei allen analysierten Explantaten Isl-1<sup>+</sup> Neurone unter den Zellen gefunden, die die POA-Explantate verließen. Nach der Zugabe von EphB1-Fc konnten dagegen nur noch bei 76 % der POA-Explantate ausmigrierende Isl-1<sup>+</sup> Neurone gefunden werden. Bei diesen verließen auch weniger Isl-1-exprimierende Zellen das Gewebe, welche im Schnitt nur  $28 \pm 1 \mu\text{m}$  weit migrierten (n=31 Explantate; 3 Experimente), verglichen mit  $50 \pm 1,1 \mu\text{m}$  in den Kontrollen (n=18 Explantate; 3 Experimente; \*\*p<0,01; studentscher t-Test; Abb. 19C, F; F', G; G'). Ähnliches ergab sich auch beim Vergleich der drei am weitesten aus den POA-Explantaten ausgewanderten Isl-1<sup>+</sup> Zellen. Wiederrum wurde jedoch kein Unterschied für Isl-1<sup>-</sup> corticale Interneurone zwischen Experiment- und Kontrollbedingungen gefunden ( $147 \pm 6,1 \mu\text{m}$  mit Fc; n=10 Explantate und  $175 \pm 13,6 \mu\text{m}$  mit EphB1-Fc; n=28 Explantate; Abb. 19E).

Die bisherigen Experimente deuten darauf hin, dass EphB1 für Isl-1<sup>+</sup> Zellen, die für das Striatum bestimmt sind, als Stopp-Signal wirkt, das diese Zellen in ihrem Zielgebiet hält. Im Gegensatz dazu wirkt es auf Isl-1<sup>-</sup> Neurone als ein repulsives Signal, welches keinen Einfluss auf die Motilität der Zellen hat. EphB1 verhindert, dass diese Zellen in das Striatum einwandern und kanalisiert sie so auf ihrem Weg Richtung Cortex (Abb. 20).

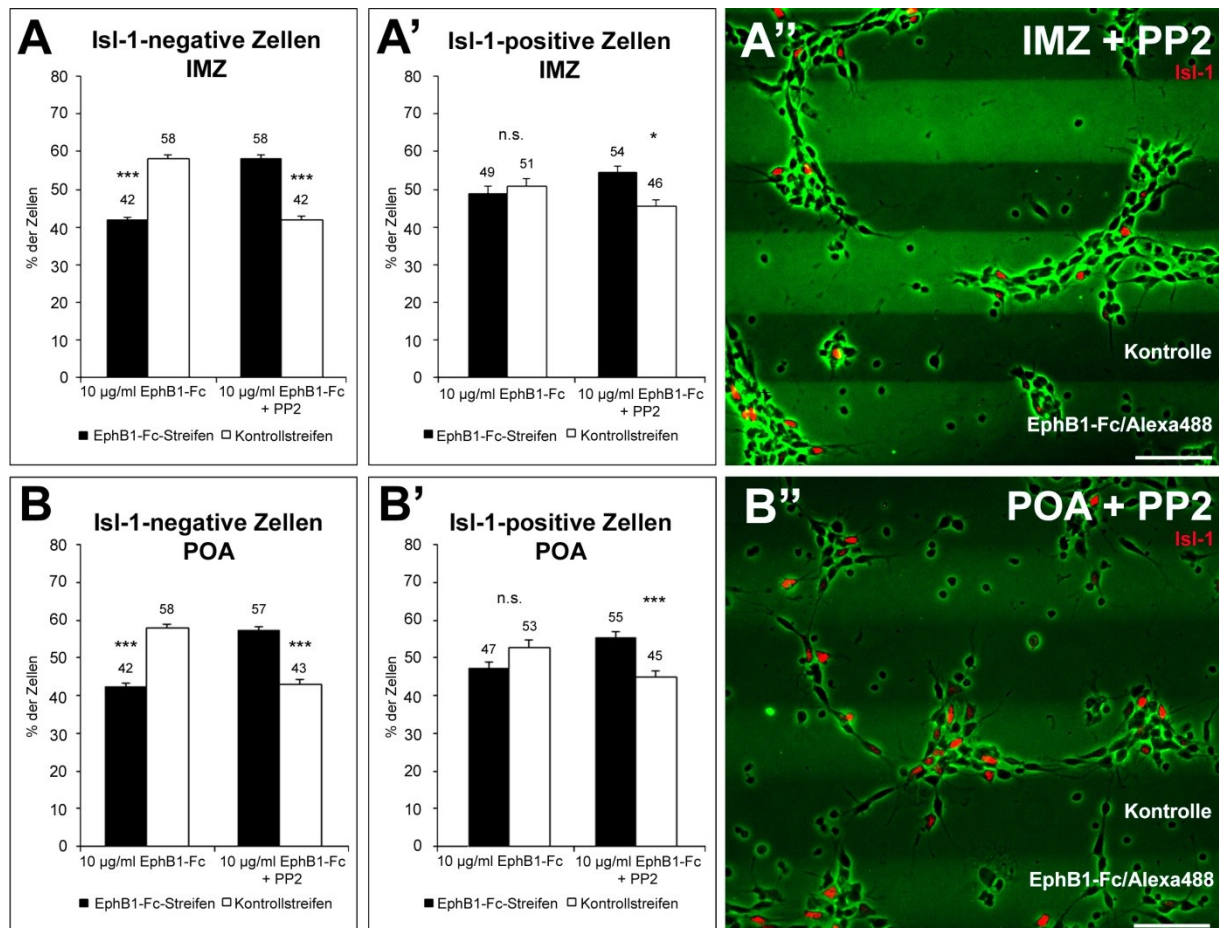


**Abb. 20: Migrationswege striataler und corticaler Interneurone im basalen Telencephalon.** Schematische Darstellung eines coronalen E14-Hirnschnittes der linken Hemisphäre, in dem die Migrationswege striataler Neurone (rot) und corticaler Interneurone des ventralen Migrationsstromes (blau) verzeichnet sind. Medial ist rechts und dorsal ist oben. H – Hippocampus, LGE – laterale ganglionische Eminenz, MGE – mediale ganglionische Eminenz, NCtx – Neocortex, PCtx – piriformer Cortex, POA – präoptisches Areal, Str – Striatum.

#### 4.5.3. Die Wirkung von EphB1 wird über Src-Kinasen vermittelt

Um den Stopp-Effekt von EphB1 auf striatale Neurone näher zu untersuchen, wurden die EphB1-Fc-Streifenexperimente wiederholt, jedoch in Kombination mit einer Isl-1-Immunmarkierung. Zudem wurden nicht ganze MGEs zur Einzelzellgewinnung verwendet, sondern aus coronalen Schnitten wurden spezifisch die IMZ und die POA herausgeschnitten, um Zellen des ventralen Migrationsweges zu erhalten. Wie von den vorhergehenden Streifenexperimenten erwartet, vermieden Isl-1<sup>-</sup> corticale Interneurone beider Regionen nach 2 DIV die EphB1-Fc-Streifen (Abb. 21A-B, links). Im Gegensatz dazu waren die Isl-1-positiven Neurone jeweils gleichmäßig über das Streifenfeld verteilt, ohne Präferenz für einen Streifentyp (Abb. 21A'-B', links). Wenn jedoch EphB1 auf diese Zellen eine stoppende Wirkung haben soll, so ist keine Gleichverteilung der Zellen zu erwarten, sondern dass die Isl-1<sup>+</sup> Neurone vorzugsweise auf den EphB1-Fc-Streifen zu finden sind, da sie auf diesen zu liegen kommen.

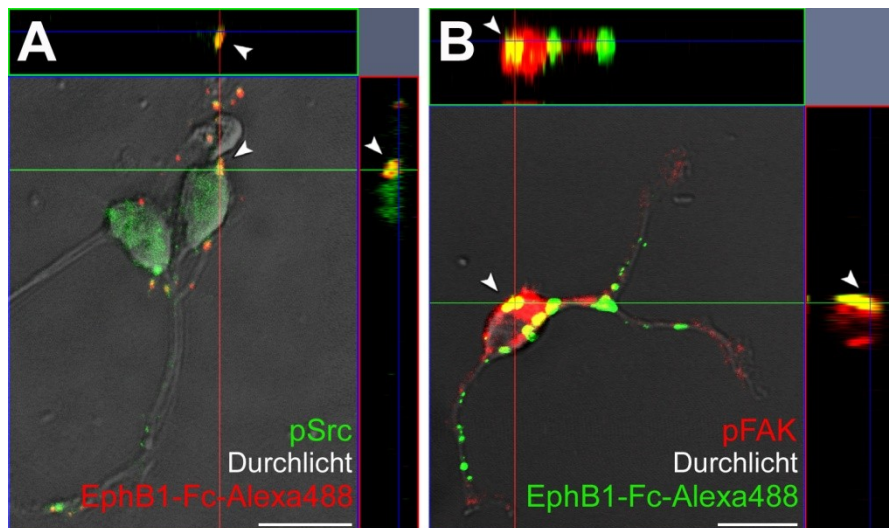
Um diesen Widerspruch zu lösen, wurden die durch EphB1 ausgelösten *reverse signaling* Signaltransduktionswege in Isl-1<sup>+</sup> und Isl-1<sup>-</sup> Zellen näher untersucht. Vorangegangene Studien haben Anhaltspunkte dafür geliefert, dass Src, ein Mitglied der Src-Familie-Kinasen, oft mit Ephrin-B-Liganden assoziiert ist und *reverse signaling* vermittelt (Palmer et al., 2002, Zimmer et al., 2011). Daher wurde geprüft, ob die Inhibition von Src einen Einfluss auf die Wirkung von EphB1 auf die zwei Zellpopulationen hat. Dazu wurde der Src-Inhibitor PP2 (Hanke et al., 1996) im EphB1-Fc-Streifenassay eingesetzt und anschließend wieder die Verteilung der striatalen und corticalen Interneurone nach 2 DIV ermittelt. Nachdem Src durch Zugabe von PP2 blockiert worden war, wechselte die Reaktion der Isl-1<sup>-</sup> Zellen aus der IMZ und der POA von Repulsion, die unter Kontrollbedingungen zu beobachten war, zu Attraktion bzw. vermehrter Adhäsion. Wie in den Diagrammen in Abb. 21A und B (rechts), sowie in den Beispielbildern in Abb. 21A'' und B'' zu erkennen ist, wuchs die Mehrzahl der Neurone unter Einfluss von PP2 auf den EphB1-Fc-Streifen. Damit befand sich in etwa der gleiche Anteil VMS-Zellen nun auf den EphB1-Fc-Bahnen, der diese ohne Inhibitor vermieden hat. Überraschenderweise zeigten Isl-1<sup>+</sup> striatale Zellen, welche unter Kontrollbedingungen nicht auf die EphB1-Fc-Streifen zu reagieren schienen, nun nach Blockierung von Src ebenfalls eine Präferenz für EphB1, so wie die Isl-1<sup>-</sup> corticalen Interneurone (Abb. 21A'-B'; rechts). Die Zugabe des Kontrollpeptides PP3 hatte keine Auswirkung auf die Verteilung der Zellen, da die Neurone beider Populationen auf die EphB1-Fc-Streifen wie im Kontrollexperiment ohne irgendeine Behandlung reagierten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 21: Die Verteilung Isl-1-negativer und -positiver Neurone auf EphB1-Fc-Streifen ist Src-abhängig.** A-B', Quantifizierung der Verteilung Isl-1-negativer (A-B) und Isl-1-positiver (A'-B') Zellen des ventralen Migrationsstromes, aufgeteilt in Zellen aus der IMZ der MGE (A, A') und aus der POA (B, B') auf alternierenden Streifen aus Alexa488-markiertem EphB1-Fc und Kontrolle (links). In einigen Experimenten wurde dem Medium der Src-Inhibitor PP2 zugegeben (rechts A-B'; A''-B''). \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Studentischer t-Test. Maßstab: 50 µm.

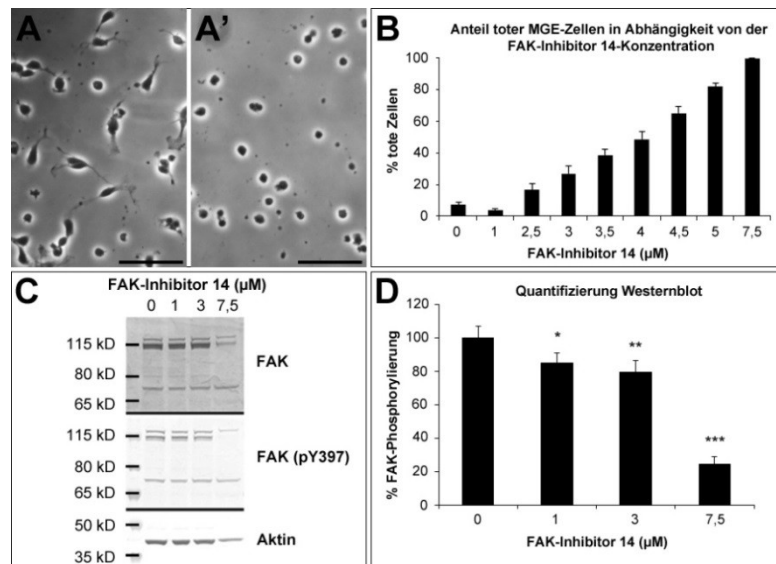
#### 4.5.4. Neben Src ist auch FAK in das *downstream-signaling* der B-Liganden involviert

Neben Src wurde auch die Wirkung der *focal adhesion kinase* (FAK) untersucht, welche häufig mit Src assoziiert vorliegt. FAK und Src bilden dabei oft einen Komplex, in dem FAK an Tyr397 autophosphoryliert wird und dadurch sowohl an Src bindet, als dieses auch durch Phosphorylierung von Tyr418 aktiviert. Konfokale Laser-Scanning-Aufnahmen zeigten sowohl eine Kolo-kalisation von Src [pY418] (Abb. 22A) als auch von FAK [pY397] und Alexa488-gekoppelten EphB1-Fc-Bindungsstellen (Abb. 22B), was darauf hindeutet, dass die Bindung von EphB1 an VMS-Neurone sowohl Src als auch FAK aktiviert. Zudem sehen sich beide immunzytochemischen Markierungen sehr ähnlich und beide zeigen Kolo-kalisationen mit EphB1-Bindestellen, was darauf schließen lässt, dass FAK und Src einen Signalkomplex bilden. Eine direkte Kolo-kalisation von pFAK und pSrc konnte aufgrund fehlender passender Antikörper nicht nachgewiesen werden. Dennoch zeigte sich, dass Experimente, in denen FAK blockiert wurde, die gleichen Ergebnisse brachten wie jene, in denen ein Src-Inhibitor eingesetzt wurde. Um die FAK-Autophosphorylierung an der Aktivierungsstelle Tyr397 zu verhindern, wurde FAK-Inhibitor 14 eingesetzt.



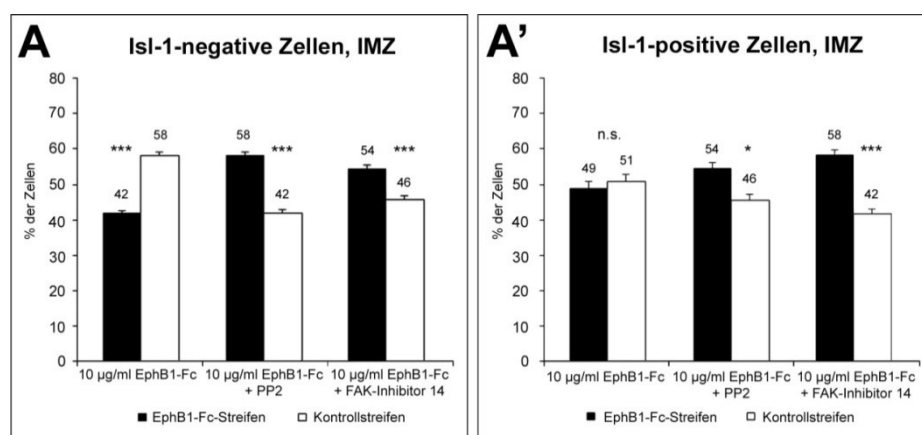
**Abb. 22: Orthogonale Ansicht der Kolo-kalisation von EphB1-Bindestellen und pSrc (A) oder pFAK (B) auf VMS-Neuronen exemplarisch für Zellen präpariert aus der IMZ. Die Pfeilspitzen zeigen Kolo-kalisationen an. Maßstab 10 µm.**

Da im Gegensatz zu PP2, dessen einzusetzende Konzentration und Inhibitionseffizienz bereits von Zimmer (2007a) getestet wurde, jedoch für den FAK-Inhibitor 14 für neuronale Primärkulturen keine Erfahrungswerte vorlagen, wurde zunächst eine Konzentrationsreihe angelegt um die optimale FAK-Inhibitor 14-Konzentration zu ermitteln, die ein gutes Auswachsen dissoziierter Neurone weitestgehend erlaubte. Dafür wurden dissoziierte MGE-Neurone auf L-PLL-beschichteten Deckgläschen mit verschiedenen Konzentrationen von FAK-Inhibitor 14 behandelt. Dabei zeigte sich, dass bei einer Konzentration von bereits 4 µM nach 2 DIV fast 50 % der Zellen tot waren (Abb. 23B), weshalb die einzusetzende Inhibitorkonzentration zwischen 1 µM und 3 µM gewählt werden sollte, da diese Konzentrationen das Auswachsen der Neurone auf dem Substrat nur marginal beeinflussten. Die Effizienz der FAK-Blockierung wurde mittels Westernblot überprüft. Dafür wurden Einzelzellen aus ganzen E14 Gehirnen gewonnen und mit 1 µM, 3 µM oder 7,5 µM FAK-Inhibitor 14 2 DIV bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach 1 DIV, sowie 30 min vor dem Ernten der Zellen fand jeweils ein Mediumwechsel statt, bei dem der FAK-Inhibitor erneuert wurde, um eine möglichst optimale Inhibition der Zellen zu erzielen. Anschließend wurde ein Westernblot durchgeführt, um die Abnahme des pFAK-Levels nach Behandlung mit FAK-Inhibitor 14 zu verifizieren. Die Quantifizierung ergab, dass alle drei getesteten Konzentrationen zu einer Reduktion des pFAK-Levels in den Zellen führten (Abb. 23D). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Konzentrationsreihe wurde in den nachfolgenden Experimenten 3 µM Inhibitor eingesetzt. Bei dieser Konzentration wurde das Wachstum der Zellen kaum negativ beeinflusst, und das pFAK-Level war um 21 % gesenkt (Abb. 23C und D, n=4 unabhängige Experimente).



**Abb. 23: Etablierung des Einsatzes von FAK-Inhibitor 14.** A-A', Beispiele für eine E14 MGE-Einzelzellkultur mit 3 μM FAK-Inhibitor 14 (A) in der das Wachstum und die Morphologie der Zellen nach 2 DIV nur marginal beeinflusst wurde, sowie mit 7,5 μM FAK-Inhibitor 14 (A'), die zu einem nahezu vollständigen Zellsterben führte. (B) Ermittlung der optimalen finalen Inhibitor-Menge durch Bestimmung des Anteils toter Zellen in E14 MGE-Einzelzellkulturen mit ansteigender FAK-Inhibitor 14-Konzentration nach 2 DIV. C-D, Westernblot zum Nachweis der Abnahme des pFAK-Levels von E14 Neuronen nach Behandlung mit FAK-Inhibitor 14 (C). Für dessen Quantifizierung (D) wurden die pFAK-Banden mit den FAK-Banden verglichen, welche gegen Aktin normalisiert waren. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; Studentischer t-Test. Maßstab 50 μm.

Der Einsatz des FAK-Inhibitors im EphB1-Fc-Streifenassay zeigte sehr ähnliche Ergebnisse wie die, welche mit Src-Inhibitor PP2 gewonnen wurden. Nach Behandlung mit FAK-Inhibitor 14 konnte bei aus der IMZ gewonnenen Isl-1<sup>-</sup> corticalen Interneuronen der gleiche Wechsel von Repulsion zu Attraktion beobachtet werden, den diese auch unter PP2 zeigten (im Diagramm mittig). Nach 2 DIV wuchsen  $54,4 \pm 0,9\%$  der Isl-1<sup>-</sup> Zellen bevorzugt auf den EphB1-Fc-Bahnen (Abb. 24A, rechts; \*\*\*p<0,001, gepaarter t-Test). Ebenso zeigten Isl-1<sup>+</sup> Neurone wie schon nach Applikation von PP2 eine deutliche Präferenz für die EphB1-Fc-haltigen Streifen (Abb. 24A', rechts; \*\*\*p<0,001, gepaarter t-Test) im Vergleich zur Kontrollsituation ohne Behandlung (im Diagramm links).



**Abb. 24: Die Verteilung Isl-1-negativer und -positiver Neurone auf EphB1-Fc-Streifen ist sowohl abhängig von Src als auch von FAK.** Quantifizierung der Verteilung Isl-1-negativer (A) und Isl-1-positiver (A') Zellen aus der IMZ im EphB1-Fc-Streifenassay. Vergleichend werden die Daten aus Abb. 21 dargestellt - EphB1-Fc-Streifen ohne Behandlung (links), sowie nach Behandlung mit Src-Inhibitor PP2 (mittig) - und die Verteilung der Zellen nach Zugabe von FAK-Inhibitor 14 (rechts). Nach Inhibition von FAK zeigte sich die gleiche Präferenz für die EphB1-Streifen, die auch unter PP2 zu beobachten war. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001; Studentischer t-Test.

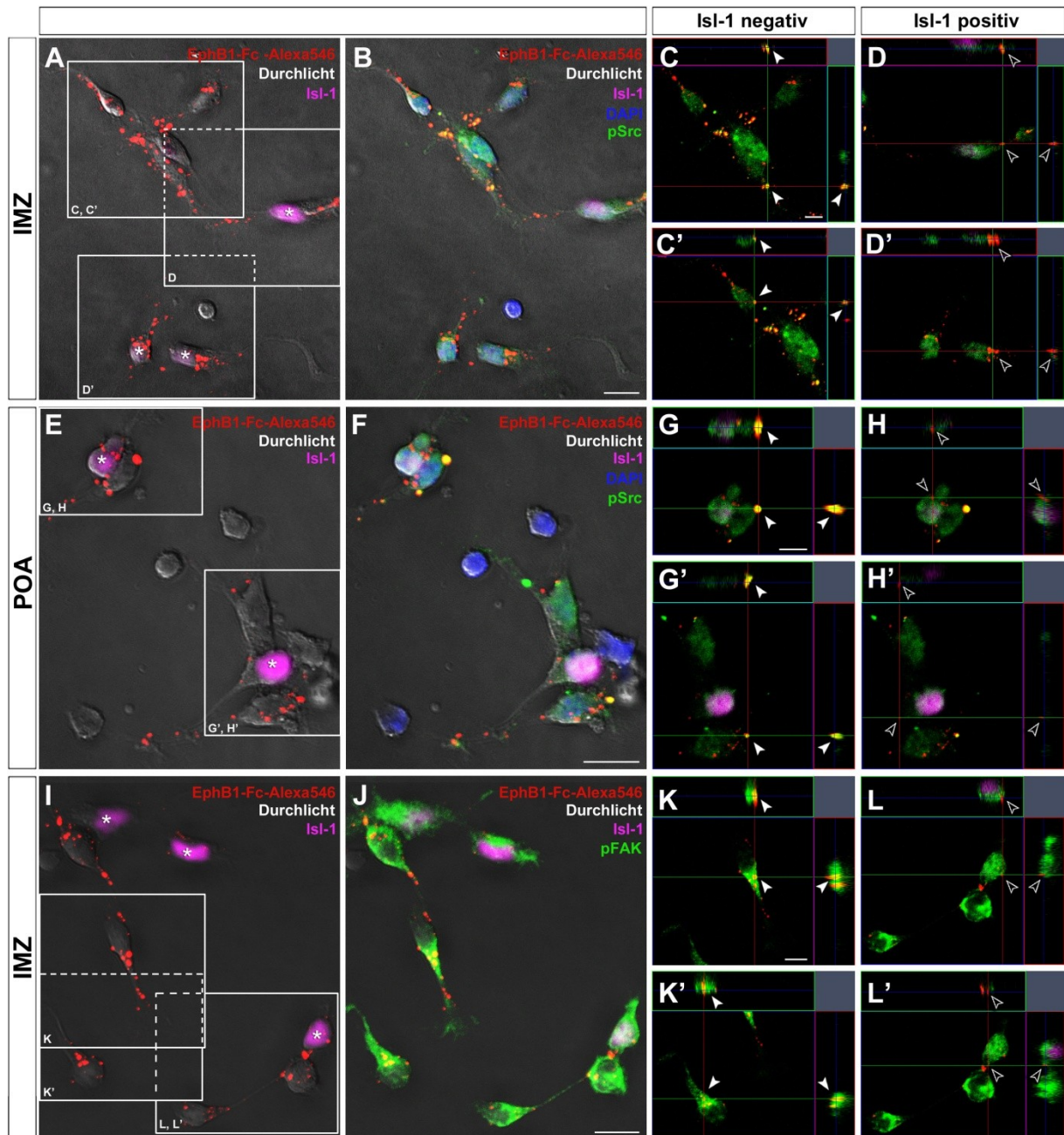
#### 4.5.5. EphB1 stoppt striatale Neurone durch Reduktion ihres endogenen pSrc-Levels

Somit konnte mit Hilfe von Inhibitoren gezeigt werden, dass sowohl Src als auch FAK an der EphB1-/Ephrin-B3-Interaktion beteiligt sind und EphB1-induziertes *reverse signaling* vermitteln. Um diesen Aspekt noch näher zu untersuchen, wurde der Gehalt an phosphoryliertem Src in Isl-1-positiven und -negativen Zellen, die auf EphB1-Fc-Streifen kultiviert wurden, bestimmt. Dafür wurde eine Doppelimmunmarkierung gegen Isl-1 und pSrc durchgeführt und die Fluoreszenzintensitäten des pSrc-Signals von Isl-1-positiven und -negativen Zellen auf den EphB1-Fc- oder Kontrollstreifen mit Hilfe von *ImageJ* vermessen. Dabei zeigte sich, dass Isl-1<sup>+</sup> striatale Zellen aus der POA ein allgemein höheres pSrc-Level hatten als Isl-1<sup>-</sup> corticale Interneurone. Wuchsen die Isl-1<sup>+</sup> striatalen Zellen jedoch auf EphB1-Fc-haltigen Streifen, war ihr pSrc-Gehalt um 38,3 % reduziert verglichen mit dem auf Kontrollsubstrat (\*\*p<0,01; studentscher t-Test). Im Gegensatz dazu war bei Isl-1<sup>-</sup> corticalen Zellen keine solche Reduktion des pSrc-Levels zu beobachten, wenn sie auf den EphB1-Fc-Streifen lagen, sondern vielmehr eine leichte Erhöhung. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dissoziierten Zellen aus der IMZ, sowie bei der Quantifizierung des pFAK-Levels erzielt. Diese Daten weisen darauf hin, dass der Gehalt an phosphoryliertem, und damit aktiviertem Src in Isl-1<sup>+</sup> striatalen Neuronen generell höher ist als in Isl-1<sup>-</sup> corticalen Interneuronen. Werden diese striatalen Zellen jedoch EphB1 ausgesetzt, dann sinkt ihr pSrc-Level. Im Gegensatz dazu führt die Bindung von EphB1 in corticalen Interneuronen zu einer Aktivierung von Src. Das gleiche gilt für die Aktivierung von FAK, was die Annahme unterstützt, dass FAK und Src einen Signalkomplex bilden.

#### Src und FAK bilden einen Signalkomplex

Um die Hypothese zu verifizieren, dass FAK und Src einen Signalkomplex bilden, wurden die in Abb. 22 dargestellten EphB1-Fc-Bindungsstudien wiederholt, zusätzlich kombiniert mit einer Immunmarkierung gegen Isl-1, um bei der Phosphorylierung von Src und FAK durch EphB1 zwischen Isl-1-positiven und -negativen Zellen unterscheiden zu können. Die Analyse der Kolo-kalisationen zwischen EphB1-Bindestellen und pSrc bzw. pFAK ließ deutlichen einen Unterschied zwischen Isl-1-positiven und -negativen Zellen erkennen. In Isl-1<sup>-</sup> corticalen Interneuronen wurden starke Überlappungen zwischen dem Alexa546-markierten EphB1-Fc und dem pSrc-Signal in Zellen aus der IMZ oder der POA gefunden, was darauf hinweist, dass EphB1 nach der Bindung an B-Liganden an dieser Stelle zu einer Phosphorylierung von Src führte (Abb. 25C, C', G, G'; gefüllte Pfeilspitzen). Identische Ergebnisse wurden auch für pFAK gefunden, in Abb. 25K, K' exemplarisch dargestellt für Zellen aus der IMZ. In Isl-1-exprimierenden striatalen Zellen (magenta, markiert mit \*) konnten im Gegensatz dazu keine oder, verglichen mit denen in Isl-1<sup>-</sup> Zellen, nur sehr schwach ausgeprägte Kolo-kalisationen von EphB1-Bindestellen mit pSrc (Abb. 25D, D', H, H'; offene Pfeilspitzen) oder pFAK (Abb. 25L, L'; offene Pfeilspitzen) gefunden werden. Dies stützt die oben stehende Hypothese, dass EphB1 in striatalen Neuronen keine Phosphorylierung von Src und FAK induziert, sondern vielmehr deren Level durch Dephosphorylierung reduziert. Die in Abb. 22 gezeigten Zellen müssten demnach Isl-1<sup>-</sup> Neurone darstellen, was auch wahrscheinlich ist, da sie aus der IMZ gewonnen wurden, in der nur 12,4 % der Zellen Isl-1 exprimieren.

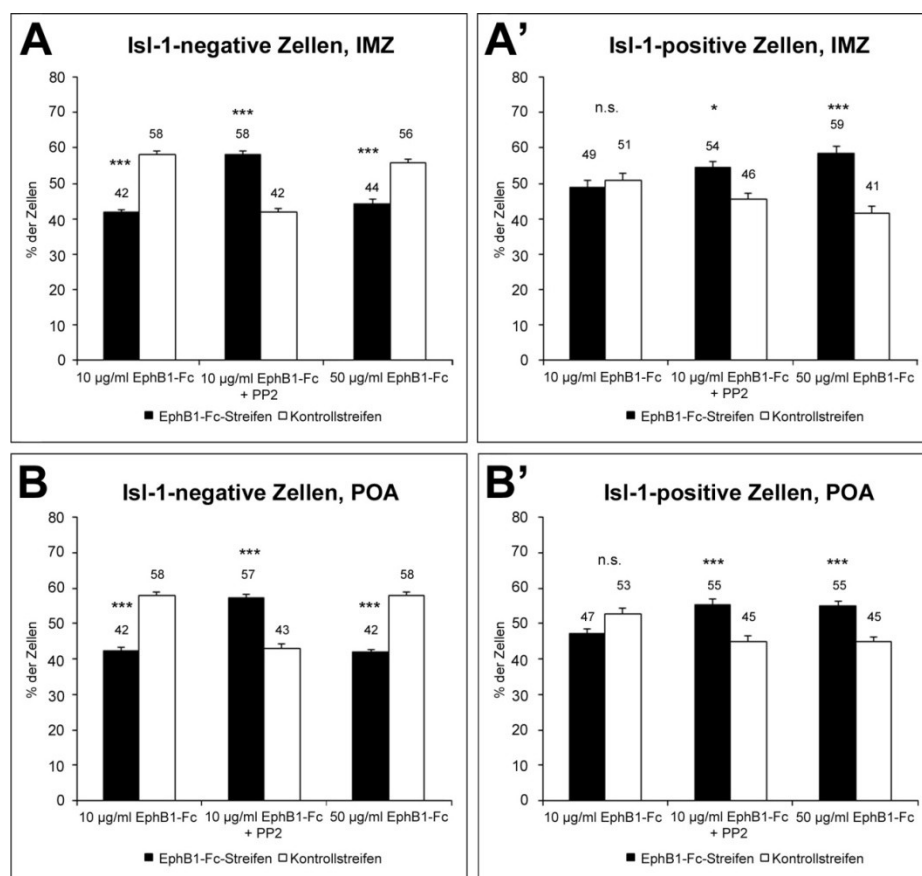




**Abb. 25: Kolokalisationsstudie von fluoreszenzgekoppeltem EphB1-Fc und pSrc (A-H) oder pFAK (I-L) an striatalen und corticalen Interneuronen des ventralen Migrationsstroms.** In A-D sind Beispiele für Neurone aus der IMZ und in E-H für POA-Zellen dargestellt, welche in beiden Fällen in der orthogonalen Ansicht eines Einzelbildes aus dem z-Stapel Kolokalisationen zwischen Alexa546-markierten EphB1-Fc-Bindestellen und pSrc für Isl-1-negative corticale Interneurone zeigen (C, C', G, G'; gefüllte Pfeilspitzen). Für Isl-1-exprimierende Zellen (\*) wurden solche Überlappungen dagegen nicht gefunden (D, D', H, H'; offene Pfeilspitzen). Das gleiche erwies sich für die Kolokalisation mit pFAK, exemplarisch gezeigt für IMZ-Zellen (I-L). Maßstab 10 µm.

Obwohl für Isl-1-positive striatale Neurone kein präferentielles Wachstum im Streifenassay zu beobachten war, konnten für diese Zellen dennoch unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten auf diesen Streifen gemessen werden, die darauf hindeuten, dass das pSrc-Level dieser Zellen sinkt, wenn sie sich auf EphB1-Fc-haltigem Substrat befinden. Daher wurde im nächsten Schritt geprüft, ob möglicherweise die eingesetzte EphB1-Konzentration in diesem Assay nicht hoch genug war, um das pSrc-Level ausreichend zu reduzieren, um die Isl-1<sup>+</sup> Zellen auf den EphB1-Fc-Streifen zu stoppen. Aus diesem Grund wurde der Versuch mit einer 5-fach höheren Konzentration der EphB1-Streifen

wiederholt. Wie in Abb. 26A'-B' (rechts) zu sehen, waren die Isl-1<sup>+</sup> Zellen jetzt nach 2 DIV nicht mehr gleichverteilt, sondern befanden sich plötzlich vermehrt auf den höher konzentrierten EphB1-Fc-Streifen. Gleichzeitig vermieden die Isl-1<sup>-</sup> corticalen Interneurone die EphB1-Fc-Streifen und wuchsen bevorzugt auf dem Kontrollsubstrat (Abb. 26A-B; rechts). Hochkonzentrierte EphB1-Fc-Streifen hatten demnach den gleichen Effekt auf die Isl-1<sup>+</sup> striatalen Neurone wie die Behandlung mit PP2 auf niedrigkonzentrierten Streifen. Beides verringerte das endogene Level an pSrc, ließ die Zellen damit anhalten und führte so zu einer Präferenz der EphB1-Fc-Streifen (Abb. 26A'-B'). Corticale Interneurone des VMS (IMZ und POA) zeigen den beobachteten Switch von Repulsion zu Attraktion (Abb. 26A, B; Mitte) jedoch nur bei Blockierung der Src-Kinasen durch PP2, da dieser Effekt Src-vermittelt ist. Eine Erhöhung der EphB1-Fc-Konzentration lässt die Zellen dagegen weiterhin die EphB1-Fc-Streifen vermieden (Abb. 26A-B; rechts).



**Abb. 26: Verteilung Isl-1-negativer und -positiver Neurone auf EphB1-Streifen unterschiedlicher Konzentration.** Quantifizierung der Verteilung Isl-1-negativer (A-B) und Isl-1-positiver (A'-B') Zellen des VMS im EphB1-Fc-Streifenassay. Vergleichend werden die Daten aus Abb. 21 dargestellt – EphB1-Fc-Streifen ohne Behandlung (links), und nach Behandlung mit Src-Inhibitor PP2 (Mitte) – sowie zusätzlich die Verteilung der Zellen auf 5-fach höher konzentrierten EphB1-Fc-Streifen (rechts). Isl-1-positive Zellen zeigten die gleiche Präferenz für die hochkonzentrierten EphB1-Streifen (A'-B', rechts), die auch unter PP2 zu beobachten war (A'-B', Mitte), während Isl-1-negative Zellen die EphB1-Fc-Streifen weiterhin vermieden. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001; Studentischer t-Test.

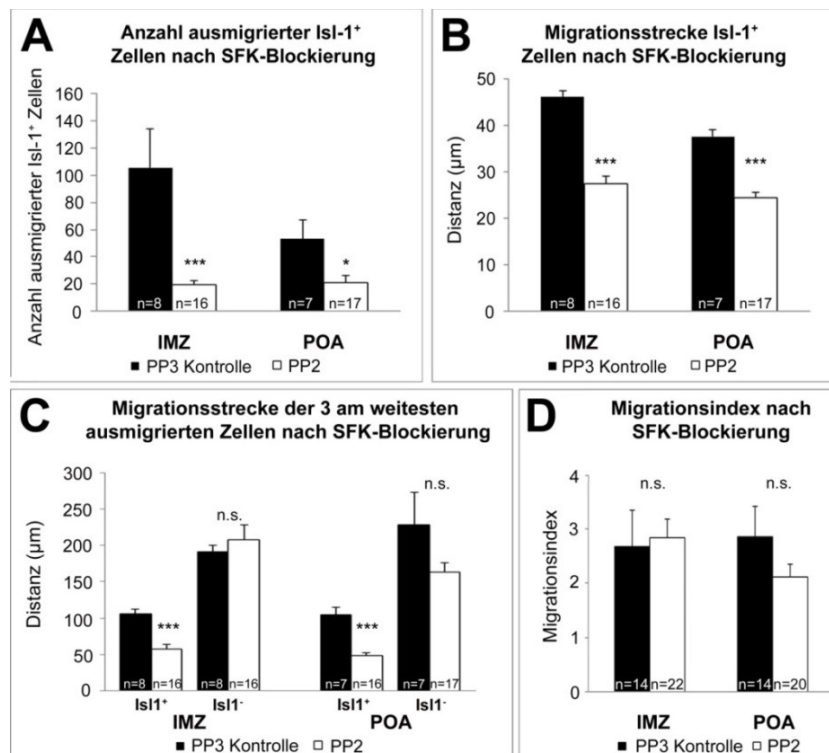
### Einsatz von Src-Inhibitor PP2 im Migrationsassay

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Bindung von EphB1 an Ephrin-B3-Liganden zu einer Abnahme des endogenen pSrc-Gehaltes in Isl-1-exprimierenden striatalen Zellen führt, wodurch diese Zellen in ihrer Migration gestoppt werden. Um diese Theorie direkt zu testen, wurde der



Migrationsassay wiederholt, jedoch wurde diesmal dem Medium statt rekombinantem EphB1-Fc der Src-Inhibitor PP2 zugesetzt. In Übereinstimmung mit der obigen Hypothese führte die Reduktion des pSrc-Levels durch PP2 zu einer starken Abnahme der Migration Isl-1-positiver Zellen, da weniger Isl-1<sup>+</sup> Neurone die Explantate verließen und auch nicht so weit migrierten (Abb. 27A, B). Im Gegensatz dazu wurden Isl-1-negative Neurone durch PP2-Applikation wie schon bei der Stimulation mit EphB1-Fc nicht beeinflusst. Dies zeigte sich sowohl bei der Betrachtung der drei am weitesten ausmigrierten Zellen, bei der nur Isl-1<sup>+</sup> Neurone unter Einfluss von PP2 weniger weit migrierten (Abb. 27C), als auch bei der Bestimmung des Migrationsindexes (Abb. 27D) als Maß für das allgemeine Auswachsen der Explantate. Die Behandlung mit dem Kontrollprotein PP3 hatte allgemein keine Wirkung auf das Migrationsverhalten beider Zelltypen. Diese Resultate fanden sich wie schon zuvor sowohl für Explantate aus der IMZ als auch für welche aus der POA.

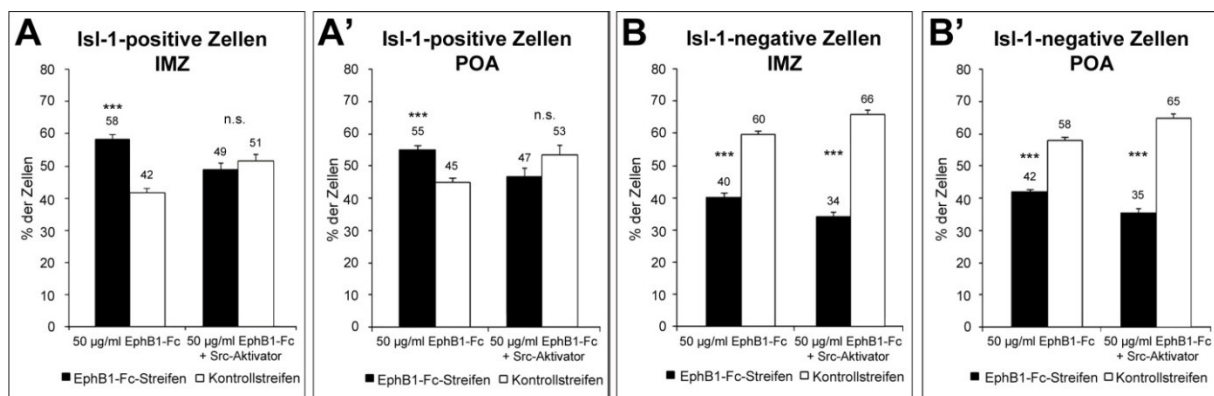
Dementsprechend stoppt die pharmakologische Reduktion von endogenem pSrc die Migration striataler, aber nicht corticaler Interneurone. Dies lässt den Schluss zu, dass EphB1 für Isl-1<sup>+</sup> Neurone den gleichen Effekt hat wie die Behandlung mit PP2: es führt zu einer Abnahme des Gehaltes an phosphoryliertem aktivem Src in Isl-1<sup>+</sup> Zellen und bringt diese somit zum Anhalten. Im Gegensatz dazu wirkt EphB1 auf Isl-1<sup>-</sup> corticale Interneurone als reiner repulsiver Faktor. Eine Reduktion von pSrc durch Behandlung mit PP2 bewirkt dabei eine Umkehr von Repulsion zu Attraktion im Streifenassay, während weder EphB1 noch PP2 einen Einfluss auf die Motilität dieser Zellen haben.



**Abb. 27: Die Blockierung von Src-Kinasen durch PP2 lässt striatale Zellen stoppen.** Die Wiederholung des in Abb. 19 gezeigten Migrationsassays, in welchem dem Medium jedoch nun statt EphB1 der Src-Inhibitor PP2 zugegeben wurde, zeigt, dass eine Reduktion des endogenen pSrc-Levels durch PP2 ebenfalls zum Stopp striataler Zellen führt. Dies ergab die quantitative Analyse der Anzahl (A) und der Migrationsstrecke (B) der Isl-1<sup>+</sup> Neurone, sowie die Distanz der drei am weitesten migrierten Zellen (C) von IMZ- und POA-Explantaten nach Zugabe des Kontrollproteins PP3 (schwarze Balken) bzw. des Src-Inhibitors PP2 (weiße Balken). Nach Behandlung mit PP2 verließen weniger Isl-1<sup>+</sup> Zellen die Explantate (A) und migrierten kürzere Strecken (B, C), während sich der Migrationsindex (D) und die Migrationsstrecke Isl-1<sup>-</sup> Zellen (C) nicht veränderte.

### Einsatz eines Src-Aktivators im EphB1-Fc-Streifenassay

Die vorangehenden Experimente deuten darauf hin, dass eine Reduktion des pSrc-Levels durch Bindung von EphB1 Isl-1-exprimierende Zellen stoppen lässt. Dies konnte durch pharmakologische Reduktion des pSrc-Gehalts durch einen Inhibitor bestätigt werden. Umgekehrt sollte die Erhöhung des pSrc-Levels durch Applikation eines Src-Aktivators den von EphB1 induzierten Stopp-Effekt aufheben. Der Src-Aktivator stellt laut Hersteller eine Phosphopeptid-Sequenz dar, welche Mitglieder der Src-Familie Kinasen aktiviert, indem er an ihre SH2-Domänen bindet (Lu et al., 2009). Die oben beschriebenen Streifenassays deuten darauf hin, dass die Präferenz für die hochkonzentrierten EphB1-Fc-Streifen von Isl-1<sup>+</sup> Zellen durch eine Reduktion ihres pSrc-Levels hervorgerufen wird. Diese Annahme konnte bestätigt werden, da die striatalen Zellen in Anwesenheit des Src-Aktivators nicht mehr auf den hochkonzentrierten EphB1-Fc-Streifen zu liegen kamen, wie sie es zuvor ohne Behandlung taten (vergleiche Abb. 28A, A'; links). Die Verringerung des pSrc-Levels durch Bindung von EphB1-Fc wurde durch Zugabe des Src-Aktivators verhindert, wodurch die Isl-1<sup>+</sup> Zellen nicht mehr gestoppt wurden und so nun nach 2 DIV gleichverteilt auf beiden Streifentypen vorlagen (Abb. 28A, A', rechts). Im Gegensatz dazu vermieden Isl-1<sup>-</sup> corticale Neurone das EphB1-Fc-Substrat weiterhin (Abb. 28B, B').



**Abb. 28: EphB1 stoppt striatale Neurone durch Reduktion ihres endogenen pSrc-Levels.** Verteilung Isl-1-positiver (A, A') und -negativer (B, B') Neurone aus der IMZ und der POA auf hochkonzentrierten EphB1-Fc-Streifen unter Kontrollbedingungen (links) und nach Behandlung mit einem Src-Aktivator (rechts). In Isl-1-positiven Zellen führt die Bindung von EphB1 zu einer Reduktion des pSrc-Levels, wodurch die Zellen gestoppt werden und vermehrt auf den EphB1-Fc-Streifen zu liegen kommen (A, A'; links). Wird diese pSrc-Reduktion jedoch durch Zugabe eines Src-Aktivators verhindert, werden die Zellen nicht mehr gestoppt und liegen nach 2 DIV gleichverteilt vor (A, A'; rechts). Im Gegensatz dazu vermeiden Isl-1-negative corticale Interneurone unter beiden Bedingungen die EphB1-Fc-Streifen (B, B'). \*\*\*p<0,001; Studentischer t-Test.

### 4.6. Migrationsdefekte striataler und corticaler Interneurone in Ephrin-B3-knockout-Mäusen

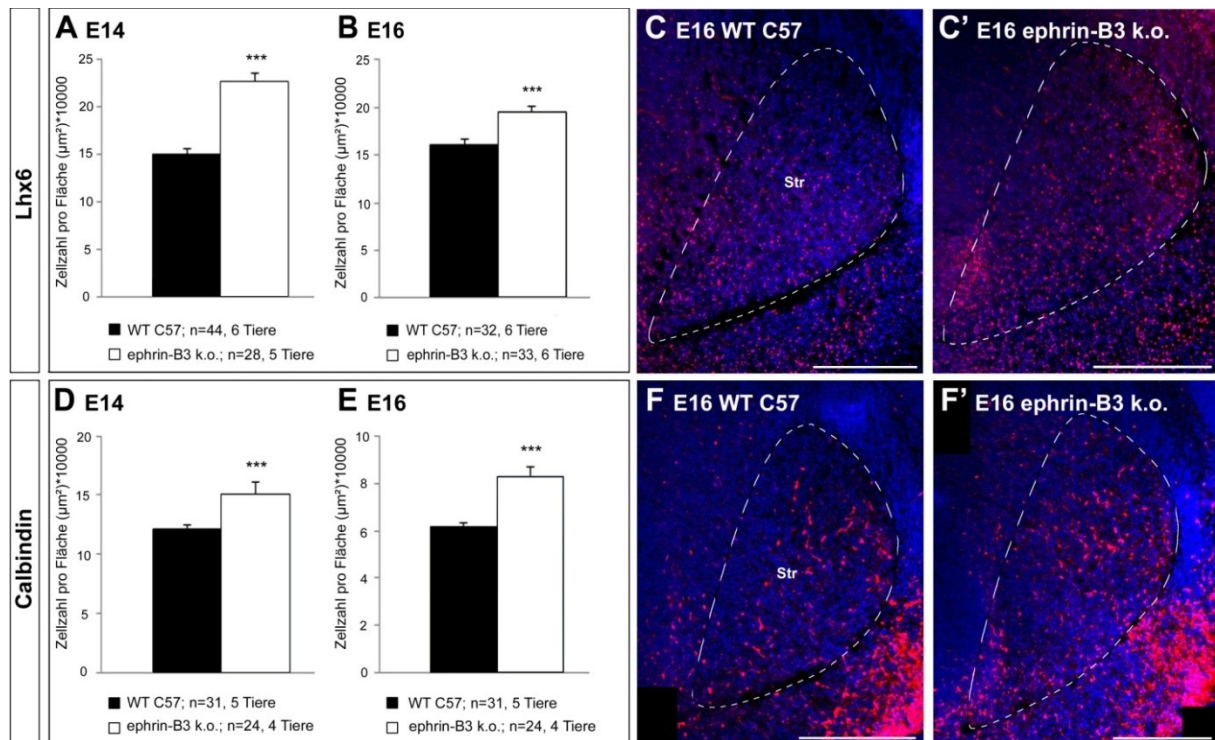
Die bis jetzt gezeigten *in vitro*-Daten deuten darauf hin, dass ein einzelner Faktor, EphB1, in unterschiedlichen Zellpopulationen verschiedene Effekte auslösen kann. Für Neurone, die für das Striatum bestimmt sind, wirkt EphB1 als ein Stopp-Signal und hält diese Zellen damit in ihrer Zielregion. Im Gegensatz dazu stellt EphB1 für corticale Interneurone einen repulsiven Lenkungsfaktor dar, der verhindert, dass die Zellen in das sich entwickelnde Striatum eindringen, sondern stattdessen weiter Richtung Cortex migrieren. Dabei ist es bemerkenswert, dass EphB1 in beiden Fällen diese differen-

tiellen Effekte über Ephrin-B3-*reverse signaling* vermittelt. Um die Wirkung von EphB1 auf striatale und corticale Interneurone direkt *in vivo* zu beurteilen, wurden diese zwei Zellpopulationen in Ephrin-B3-knockout (Ephrin-B3<sup>-/-</sup>)-Mäusen untersucht.

#### 4.6.1. Ektopische corticale Interneurone im Striatum von Ephrin-B3-knockout-Mäusen

Als erstes wurde die Verteilung corticaler Interneurone untersucht. Dafür wurden an coronalen E14 und E16 Hirnschnitten von efnB3<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen Calbindin und Lhx6 immunhistochemisch markiert. Dabei wurden nur solche Schnitte entlang der anterior-posterior-Achse in die Analyse miteinbezogen, in denen MGE, LGE und POA deutlich zu erkennen waren. Zur Quantifizierung der Anzahl Calbindin<sup>+</sup> und Lhx6<sup>+</sup> Interneurone im Striatum wurden am Axiovert Fluoreszenzmikroskop Bilder von den markierten Zellen und den DAPI-gefärbten Zellkernen aufgenommen und je Schnitt zu einem Bild zusammengesetzt. Anschließend wurden alle Lhx6- bzw. Calbindin-positiven Zellen innerhalb des Striatums ausgezählt, dessen Begrenzungen anhand der DAPI-Markierung gut sichtbar waren. Die Anzahl der ermittelten Zellen wurde auf die Fläche normiert.

Wie bereits oben beschrieben fanden sich Calbindin<sup>+</sup> und Lhx6<sup>+</sup> Neurone sowohl in der MGE und entlang des dorsalen Migrationsstromes, als auch in der POA und dem ventralen Migrationsweg corticaler Interneurone (Abb. 18B, D). Obwohl das allgemeine Muster migrierender Zellen in Ephrin-B3<sup>-/-</sup> Mäusen grundlegend intakt erschien, konnten dennoch Veränderungen im Migrationsmuster festgestellt werden, die sich in einer erhöhten Anzahl ektopischer Neurone im Striatum äußerte. Die quantitative Analyse ergab, dass die Anzahl Lhx6-positiver Neurone im Striatum an E14 von  $15 \pm 1$  Zellen/10000  $\mu\text{m}^2$  in Wildtyp-Gehirnen (n=44 Schnitte aus 6 Tieren) auf  $23 \pm 1$  Zellen/10000  $\mu\text{m}^2$  in Ephrin-B3<sup>-/-</sup>-Hirnen anstieg (n=28 Schnitte aus 5 Tieren; \*\*\*p<0,001; Abb. 29A), während sich die Anzahl DAPI-markierter Zellen in diesem Areal nicht veränderte (nicht gezeigt). Ebenso wurden an E16 mehr Lhx6-markierte Zellen im Striatum von Ephrin-B3-knockout-Tieren gefunden als in entsprechenden Wildtyp-Hirnen (Abb. 29B-C'). Ein ähnliches Resultat ergab sich für Calbindin-exprimierende Zellen. Im Striatum von Ephrin-B3<sup>-/-</sup>-Mutanten fanden sich sowohl in E14- als auch in E16-Hirnschnitten mehr Calbindin<sup>+</sup> Neurone (Abb. 29D-F'). Diese erhöhte Anzahl Lhx6- und Calbindin-exprimierender Zellen in der striatalen Anlage von Ephrin-B3-knockout-Mäusen deutet auf eine verringerte Repulsion corticaler Interneurone hin. Dies lässt sich durch das Fehlen der Ephrin-B3-Liganden in der Mutante erklären, wodurch das im Striatum exprimierte EphB1 nicht mehr detektiert werden kann.



**Abb. 29: Ektopische corticale Interneurone im Striatum von Ephrin-B3-knockout-Mäusen.** **A, B,** Quantitative Analyse der Anzahl Lhx6-positiver Zellen im Striatum an E14 (**A**) und E16 (**B**). **C, C',** Überlagerung der Lhx6-Immunmarkierung mit der DAPI-Kernfärbung. Gezeigt ist die Region des Striatums in einem Coronalchnitt einer Hemisphäre an E16. Die gestrichelte Linie markiert das Striatum. Dabei sind im Striatum von Ephrin-B3<sup>-/-</sup>-Embryos (**C'**) deutlich mehr Lhx6-gefärbte Neurone zu erkennen als im Wildtyp (**C**). Ein ähnliches Ergebnis ergab die Quantifizierung Calbindin-positiver Neurone an E14 (**D**) und E16 (**E**). **F, F',** Die Überlagerung der Calbindin-Immunmarkierung mit der DAPI-Kernfärbung eines Coronalchnittes an E16 in der Region des Striatums im Wildtyp (**F**) und im Ephrin-B3-knockout (**F'**) lässt ektopische Zellen im Striatum erkennen. \*\*\* $p < 0,001$ ; studentscher t-Test. n=Anzahl ausgewerteter Schnitte. Maßstab 250  $\mu\text{m}$ .

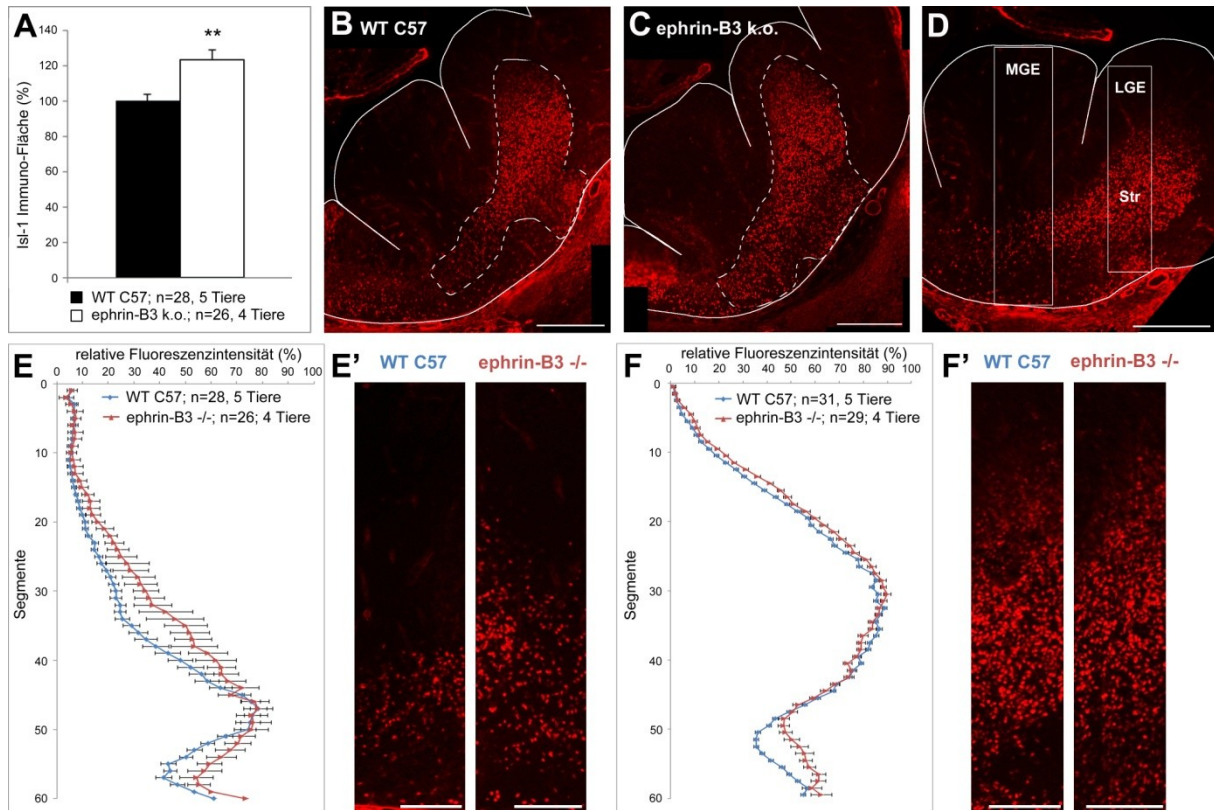
#### 4.6.2. Fehlgeleitete striatale Neurone in Ephrin-B3-knockout-Mäusen

Da sich die Migration corticaler Interneurone in Ephrin-B3<sup>-/-</sup>-Mäusen als fehlerhaft erwies, wurde auch das Migrationsmuster striataler Neurone untersucht. Dafür wurde an E14 Hirnschnitten von Wildtyp- und Ephrin-B3<sup>-/-</sup>-Tieren eine Immunmarkierung gegen Isl-1 durchgeführt, um striatale Neurone anzufärben. Wie in Abb. 18A, C und D zu erkennen ist, scheinen die meisten Isl-1<sup>+</sup> Zellen aus der POA zu kommen und Richtung Striatum in einem klar abgegrenzten Pfad zu migrieren, welcher durch die Überganszone zwischen dem dorsalen Migrationsstrom corticaler Interneurone in der SVZ und dem ventralen Migrationsweg in der IMZ führt (Pfeilspitzen). Für die Analyse des Migrationsstromes Isl-1-positiver Zellen wurde das Isl-1-Signal jedes Schnittes am Axiovert S-100 Fluoreszenzmikroskop abfotografiert und für jeden Schnitt jeweils zu einem Bild zusammengesetzt. Für die Bestimmung der Fläche, welche die markierten Zellen einnehmen, wurde der Bereich vermessen, in dem sich der Großteil der Isl-1<sup>+</sup> Neurone befand, ausgehend vom Sulcus zwischen POA und MGE, wie in Abb. 30B und C durch die weiße Markierung dargestellt. Der Vergleich ergab, dass die Isl-1-gefärbten Zellen in Ephrin-B3<sup>-/-</sup>-Mäusen gestreuter vorliegen und daher eine um  $24 \pm 5,7\%$  größere Fläche (n=26 Schnitte aus 4 Gehirnen) einnehmen als in Wildtyp-Tieren (n=28 Schnitte aus 5 Gehirnen; \*\* $p < 0,01$ ; studentscher t-Test; Abb. 30A).

Des Weiteren wurde die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten in einer Säule in dorsoventraler Ausrichtung über die MGE und die LGE gemessen, wie es durch die weißen Markierungen in Abb.



**30D** veranschaulicht wird. Alle Ausschnitte wurden anschließend auf dieselbe Pixelhöhe reduziert und mit *ImageJ* der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten bestimmt. Anschließend wurden die Plots normiert, indem jeweils der höchste gemessene Wert auf 100 % und der niedrigste Wert auf 0 % gesetzt wurde.



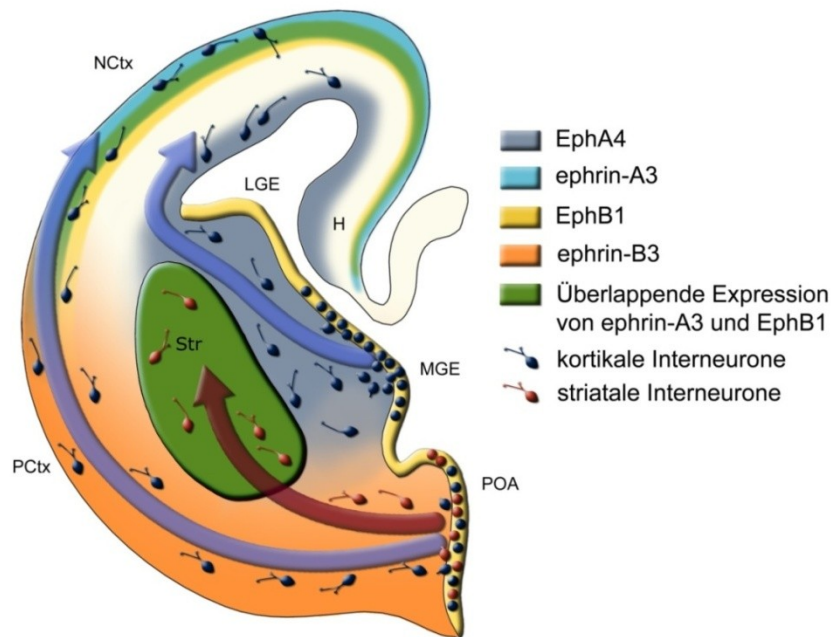
**Abb. 30: Fehlgeleitete striatale Neurone in Ephrin-B3-knockout-Mäusen.** **A**, Quantitative Analyse der Fläche immunmarkierter Isl-1<sup>+</sup> Zellen in Coronalanschnitten von Wildtyp- und Ephrin-B3<sup>-/-</sup> Mäusen an E14, wie in **(B)** und **(C)** exemplarisch dargestellt. Die weiße Markierung kennzeichnet die ausgemessene Fläche. **D**, Isl-1-Immunmarkierung eines E14 WT-Schnittes in der Orientierung, die für die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten aus E-F' verwendet wurde. Die weißen Felder markieren die Ausschnitte, welche für die Plot-Profil benutzt wurden. **E**, **E'**, Plot-Verlauf relativer Fluoreszenzintensitäten für die MGE. **F**, **F'**, Plot-Verlauf relativer Fluoreszenzintensitäten über die LGE, einschließlich der striatalen Anlage. Isl-1-exprimierende striatale Neurone sind in ihrer Migration fehlgeleitet in der Ephrin-B3<sup>-/-</sup> Mutante, was durch erhöhte Fluoreszenzintensitäten um die Übergangszone in der MGE (**E**, **E'**), sowie im piriformen Cortex ventral des Striatums (**F**, **F'**) deutlich wird. \*\*\*p<0,001, Studentischer t-Test. n=Anzahl ausgewerteter Schnitte. Maßstab: **B**- **D**, 250 µm; **E'**, **F'**, 100 µm.

Der Verlauf der normierten Fluoreszenzintensitäten zeigte in Ephrin-B3-knockout-Tieren eine erhöhte Intensität um die Übergangszone der MGE herum, was wiederum auf eine breitere Verteilung der striatalen Zellen auf ihrem im Wildtyp sonst eng begrenzten Migrationspfad hinweist (Abb. 30E, E'). Dieses Ergebnis passt zu dem oben beschriebenen Mechanismus des bidirektionalen EphA4-/Ephrin-B3-signalings, welches die Segregation von Interneuronen aus der MGE und POA in den dorsalen und ventralen Migrationsstrom vermittelt (Zimmer et al., 2011). Demzufolge könnte repulsives EphA4-/Ephrin-B3-signaling auch Isl-1-exprimierende Neurone, die ebenfalls Ephrin-B3-Liganden tragen, auf ihrem Weg Richtung Striatum halten. Wird die Ephrin-B3-Expression in der Mutante ausgeschaltet, wird dieser klar abgegrenzte Pfad verwischt. Plots durch die LGE, welche die Region des Striatums enthielten, zeigten ebenfalls eine veränderte Verteilung Isl-1<sup>+</sup> striataler Neurone. Hier wurden in der Mutante erhöhte Fluoreszenzintensitäten im Bereich des piriformen Cortex gemessen, wo im Wildtyp vorwiegend nur der ventrale Migrationsstrom vorbeiführt. Dabei zeigte sich diese breitere Verteilung Isl-1<sup>+</sup> Zellen jedoch nur nach ventral, während die dorsale Begrenzung des

Striatums nahezu unverändert blieb. Dies ist vermutlich auf anatomische Beschränkungen durch die Capsula externa zurückzuführen (Abb. 30F, F').

Der Knockout von Ephrin-B3 verändert somit nicht nur das Migrationsmuster Isl-1<sup>+</sup> corticaler Interneurone, wodurch im Vergleich zum Wildtyp mehr Zellen in das Striatum einwandern. Das Fehlen von Ephrin-B3 hat ebenfalls Auswirkungen auf die Verteilung Isl-1-exprimierender striataler Neurone, welche gestreuter durch die MGE Richtung Striatum migrieren und zudem, vermutlich durch die fehlende Weiterleitung des EphB1-Stopp-Signals, auch mehr Zellen als im Wildtyp außerhalb des Striatums in der LGE zu liegen kommen.

Zusammenfassend lässt sich damit folgendes Bild tangential migrierender Neurone zeichnen (Abb. 31): sowohl corticale Interneurone als auch striatale Zellen werden im basalen Telencephalon geboren und wandern tangential zu ihren Zielgebieten. Corticale Interneurone mit Ursprung in der MGE wandern dabei auf einem dorsalen Migrationsweg Richtung Neocortex. Dieser wird durch repulsive Lenkungs-faktoren nach dorsal (Zimmer et al., 2007) und ventral begrenzt und kanalisiert so die Neurone auf ihrem Weg Richtung Cortex. Corticale Interneurone, welche in der POA geboren werden, migrieren dagegen über den ventralen Migrationsstrom Richtung Cortex. Für die Neurone beider Migrationsströme (blaue Pfeile in Abb. 31) stellt das sich entwickelnde Striatum ein Nicht-Zielgebiet dar, in welchem die überlappende Expression der repulsiven Faktoren Ephrin-A3 und EphB1 ein Einwandern der Interneurone verhindert. Dabei wirkt Ephrin-A3 über EphA4-*forward signaling* auf die Neurone des DMS, während die Wirkung von EphB1 über Ephrin-B3-*reverse signaling* in VMS-Neuronen vermittelt wird. In der Übergangszone zwischen diesen beiden Migrationswegen, in der die Zellen miteinander in Kontakt kommen, sorgt repulsives bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-*signaling* für eine räumliche Trennung der beiden Migrationsströme. Zeitgleich werden auch striatale Neurone im basalen Telencephalon, v.a. in der POA, geboren. Diese Zellen migrieren anfangs auf einem Pfad dorsal des ventralen Migrationsstromes corticaler Interneurone in der Übergangszone zwischen SVZ und IMZ der MGE (roter Pfeil in Abb. 31) und dringen dann in das Striatum ein. Dort werden sie durch EphB1 gestoppt und so in ihrem Zielgebiet gehalten. Damit übt EphB1 eine differentielle Wirkung aus, abhängig davon, welche Zellpopulation es beeinflusst. Es kann für corticale Interneurone als repulsiver Lenkungs-faktor dienen und gleichzeitig für striatale Zellen als Stopp-Signal, wobei dieser Effekt in beiden Fällen über Ephrin-B3-*reverse signaling* vermittelt wird.



**Abb. 31: Tangential migrierende Neurone im basalen Telencephalon.** Schematische Darstellung eines coronalen E14-Hirnschnittes der linken Hemisphäre. Ephrin-A3 und EphB1 zeigen eine überlappende Expression in der striatalen Anlage und kanalisieren durch ihre repulsive Wirkung auf corticale Interneurone diese Zellen auf ihrem Weg zum Cortex (blaue Pfeile). Dabei wirkt Ephrin-A3 über EphA4-forward signaling auf die Neurone des DMS und EphB1 über Ephrin-B3-reverse signaling auf VMS-Neurone. Auf striatale Neurone aus der POA (roter Pfeil) übt EphB1 dagegen eine andere Wirkung aus. Diese Zellen werden in ihrem Zielgebiet Striatum durch EphB1/Ephrin-B3-reverse signaling gestoppt. Medial ist rechts und dorsal ist oben. H – Hippocampus, LGE – laterale ganglionische Eminenz, MGE – mediale ganglionische Eminenz, NCtx – Neocortex, PCtx – piriformer Cortex, POA – präoptisches Areal, Str – Striatum.

## 5. Diskussion

Während der Embryonalentwicklung werden die meisten Zellpopulationen nicht dort geboren, wo sie ihre späteren Aufgaben übernehmen. Für diese Zellen ist daher eine Translokation von ihrem Geburtsort zu ihren weit entfernten Zielgebieten nötig. Verschiedene Gruppen von Lenkungsfaktoren, wie Semaphorine, Slits, Neureguline und Ephrine sind daran beteiligt, diese Wanderung der Neurone zu regulieren und präzise zu lenken (Zhu et al., 1999, Marin et al., 2001, Wichterle et al., 2003, Flames et al., 2004, Nobrega-Pereira et al., 2008, Rudolph et al., 2010, Zimmer et al., 2011, Rodger et al., 2012). Die tangential Migration corticaler Interneurone von ihren Ursprungsgebieten im basalen Telencephalon hin zum Cortex wurde bereits vielfältig untersucht (Lavdas et al., 1999, Anderson et al., 2001, Marin and Rubenstein, 2001, Hernandez-Miranda et al., 2010, Zimmer et al., 2011). Aber auch striatale Neurone migrieren tangential in ihr späteres Zielgebiet, das Striatum, ein (Sussel et al., 1999, Marin et al., 2000, Marin and Rubenstein, 2001, Pauly et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass verschiedene Mitglieder des Eph/Ephrin-Systems an der Regulation der Migration striataler und corticaler Interneurone beteiligt sind. Innerhalb der corticalen Interneurone lassen sich zwei Gruppen von Zellen unterscheiden. Corticale Interneurone mit Ursprung in der MGE wandern über einen dorsalen Migrationsstrom Richtung Neocortex, während solche, die in der POA geboren werden, einen ventralen Migrationsweg nehmen. Dabei sorgt repulsives bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-*signaling* für eine räumliche Trennung der beiden Migrationsströme. Für die Neurone beider Migrationswege stellt das sich entwickelnde Striatum ein Nicht-Zielgebiet dar, in welchem die repulsiven Faktoren Ephrin-A3 und EphB1 überlappend exprimiert werden und so ein Einwandern der Interneurone in das Striatum verhindern. Zeitgleich werden auch striatale Neurone im basalen Telencephalon, v.a. in der POA, geboren. Diese Zellen exprimieren, wie die Interneurone des VMS, ebenfalls Ephrin-B3, jedoch hat EphB1 eine andere Wirkung auf sie. Diese Zellpopulation wird durch die EphB1-/Ephrin-B3-Interaktion gestoppt und so in ihrem Zielgebiet gehalten.

Somit zeigt sich, dass ein und derselbe Faktor teilweise mehrere Funktionen übernehmen kann. Bei der Segregation der zwei Migrationsströme corticaler Interneurone durch repulsives bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-*signaling*, haben EphA4 und Ephrin-B3 jeweils sowohl eine Rezeptorfunktion, als auch lenkenden Charakter. Dabei vermittelt EphA4-*forward signaling* die repulsive Wirkung von Ephrin-B3 für Zellen des dorsalen Migrationsstromes, während dieses EphA4 gleichzeitig über Ephrin-B3-*reverse signaling* repulsiv auf Interneurone des ventralen Stromes wirkt. Zusätzlich zu ihrer Funktion als Rezeptoren für den eigenen Zelltyp wirken diese Ephrine somit auch als repulsive Lenkungsfaktoren für den jeweils anderen Zelltyp. Noch deutlicher wird die mögliche Bifunktionalität von Mitgliedern der Ephrin-Familie am hier untersuchten Beispiel von EphB1. Es dient für corticale Interneurone des VMS als repulsiver Lenkungsfaktor und gleichzeitig für striatale Zellen als Stopp-Signal, wobei beide Effekte jeweils über Ephrin-B3-*reverse signaling* vermittelt werden. Damit übt EphB1 eine unterschiedliche Wirkung in zwei Zellpopulationen aus, welche sich zwar in ihren



Zielgebieten unterschieden, jedoch nicht im Zeitpunkt und Ort ihrer Entstehung und in ihrer Liganden-Ausstattung.

Eine Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen dieses Paradoxons ergab, dass diese duale Wirkung von EphB1 durch Unterschiede innerhalb der Ephrin-B3-*reverse signaling*-Signalkaskade zustande kommt, wodurch die Level an phosphoryliertem Src und FAK unterschiedlich reguliert werden. In Isl-1-exprimierenden striatalen Zellen führt die Bindung von EphB1 an Ephrin-B3 zu einer Reduktion des endogen hohen pSrc- und pFAK-Gehaltes, wodurch die Zellmigration zum Stillstand kommt. Dementsprechend wurde auch keine Kollokalisierung von EphB1-Bindestellen mit pSrc oder pFAK in diesen Zellen gefunden. Eine pharmakologische Reduktion der pSrc- oder pFAK-Level reproduzierte die Wirkungen von EphB1 und führte ebenfalls zum Stopp der Zellen. Umgekehrt wurde der bremsende Effekt von EphB1 durch künstlich erhöhte pSrc-Level aufgehoben, sodass die striatalen Neurone weitermigrierten. Im Gegensatz dazu führt die Bindung von EphB1 in corticalen Interneuronen zur Phosphorylierung von Src und FAK, wodurch der repulsive Effekt dieses Lenkungsfaktors vermittelt wird. Daher wurden im Bindungsassay in diesen Zellen auch starke Kollokalisierungen von EphB1-Bindungsstellen mit pSrc und pFAK gefunden. Die Zugabe eines Src- oder FAK-Inhibitors bewirkte eine Umkehr des EphB1-Effektes, von Repulsion zu Attraktion. Dabei hatten diese Inhibitoren jedoch keinen Einfluss auf die Motilität der Interneurone. Die Behandlung mit einem Src-Aktivator zeigte einen mit EphB1 synergistischen Effekt, da EphB1 weiterhin repulsiv auf die corticalen Interneurone wirkte. Somit stellt EphB1 für diese Zellpopulation einen Lenkungsfaktor dar, wobei die Aktivierung oder Inhibition von Src dabei über Repulsion oder Attraktion entscheidet.

Untersuchungen an Ephrin-B3-knockout-Mäusen stehen im Einklang mit diesen *in vitro*-Daten. In der striatalen Anlage homozygoter Ephrin-B3-knockout-Tiere wurden vermehrt fehlgeleitete Isl-1<sup>+</sup> corticale Interneurone gefunden, welche positiv waren für Calbindin bzw. Lhx6, da das repulsive Signal des Striatums ohne Ephrin-B3-Liganden nicht mehr detektiert werden konnte. Darüber hinaus hatte das Ausschalten von Ephrin-B3 ebenfalls einen Einfluss auf die Verteilung Isl-1<sup>+</sup> striataler Neurone. Bedingt durch das Fehlen der Ephrin-B3-vermittelten EphB1-Stopp-Funktion zeigten diese Zellen eine überschießende Migration, weshalb mehr striatale Neurone außerhalb des Striatums zu finden waren.

### 5.1. Lhx6-positive corticale Interneurone im ventralen Migrationsstrom?

In der Literatur wird Lhx6 als ein Marker für corticale Interneurone mit Ursprung in der MGE beschrieben (Lavdas et al., 1999, Fogarty et al., 2007), welche im DMS migrieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit, die in Bezug auf den Transkriptionsfaktor Lhx6 gewonnen wurden, lassen dagegen darauf schließen, dass Lhx6<sup>+</sup> Interneurone auch in der POA geboren werden und über den VMS migrieren. Zum einen zeigte die immunhistochemische Färbung gegen Lhx6 eine deutliche Markierung einzelner Zellen in der POA und dem ventralen Migrationsstrom (Abb. 18D, E), zum anderen fanden sich im Ephrin-B3-Knockout mehr Lhx6-positive Neurone im Striatum als im Wildtyp (Abb. 29A-C'), woraus sich schlussfolgern lässt, dass diese Lhx6<sup>+</sup> Zellen Teil des VMS waren,

Ephrin-B3 exprimierten und daher in der Mutante beeinflusst wurden. Betrachtet man einzelne veröffentlichte *in situ*-Hybridisierungen gegen Lhx6 jedoch genauer, so ähneln diese an E14 der in Abb. 18D gezeigten Lhx6-Immunfärbung gleichen Entwicklungsalters. Es ist dabei sowohl eine Färbung in der POA zu erkennen, als auch in der IMZ und im ventralen Migrationsstrom mit Eingang in den Cortex in der Marginalzone (Liodis et al., 2007; Abb. 1C, D). Zudem findet sich auch eine deutliche Expression von Nkx2.1 in der POA, einem Transkriptionsfaktor *upstream* von Lhx6, der die Expression von Lhx6 induziert (Nobrega-Pereira et al., 2008, Gelman et al., 2009). Dabei wird Nkx2.1 laut Flames et al. (2007) von einem Großteil der Vorläuferzellen der POA exprimiert.

In *utero*-Elektroporations-Versuche von Gelman et al. (2009) in einer Nkx2.1-Cre transgenen Mauslinie zeigten eine Nkx2.1-abhängige Expression von GFP in der MGE und der POA. GFP<sup>+</sup> Neurone, welche in der POA gefunden wurden, waren dabei zwar positiv für Calbindin, überraschenderweise jedoch nicht für Lhx6, was die Autoren schlussfolgern ließ, dass dieser Transkriptionsfaktor nur in Interneuronen aus der MGE exprimiert wird, nicht jedoch in solchen aus der POA. Dieses Ergebnis scheint jedoch fragwürdig, da Nkx2.1 *upstream* von Lhx6 liegt und daher dessen Expression unabhängig davon induzieren sollte, ob die Zellen aus der MGE oder der POA stammen. Zudem verließen diese GFP<sup>+</sup> Zellen die POA extrem weit dorsal, weshalb dieser Migrationsstrom GFP-positiver Neurone durch die VZ der MGE führte (Gelman et al., 2009; Abb. 2B, C). Dies widerspricht sowohl den Ergebnissen von Zimmer et al. (2011), als auch den hier gezeigten Immunfärbungen gegen Lhx6 aus Abb. 18, die eher darauf schließen lassen, dass Interneurone aus der POA diese ventral verlassen und sich dem VMS anschließen. Des Weiteren haben Gelman et al. (2009) gezeigt, dass diese GFP<sup>+</sup> Zellen GABAerge corticale Interneurone darstellen, die NPY-positiv, aber SST-/Lhx6-negativ sind. Sie diskutierten weiterhin, dass diese Zellen den Cortex eventuell teilweise in rostrocaudaler Richtung über die Anteriore Commissur besiedeln, wodurch sich eine erhöhte Dichte dieser Neurone in rostro-intermediären Regionen des Cortex erklären ließe.

Dementsprechend würde es sich bei diesen Lhx6-negativen corticalen Interneuronen aus der POA jedoch um eine andere Zellpopulation handeln als den Zellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Diese wandern aus der POA über den ventralen Migrationsstrom zum Cortex. Sie scheinen Lhx6 zu exprimieren, worauf sowohl hier durchgeführte Lhx6-Immunfärbungen hindeuten, als auch *in situ*-Hybridisierungen gegen Lhx6 und Nkx2.1 aus der Literatur. Zudem zeigte sich, dass sie in der Ephrin-B3-Mutante im Striatum akkumulieren, was ebenfalls für eine Beteiligung am Ephrin-B3-positiven ventralen Migrationsstrom spricht. Im Gegensatz dazu wurden jedoch keine Veränderungen für NPY<sup>+</sup> Zellen im Striatum adulter Ephrin-B3<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp gefunden (Daten nicht gezeigt), was ebenfalls darauf hindeutet, dass Gelman et al. (2009) eine andere Population von POA-Zellen untersuchte als die der vorliegenden Arbeit. *Fate mapping*-Studien könnten diesen Aspekt in Zukunft näher beleuchten.

Damit lässt sich darauf schließen, dass Lhx6 sowohl in dorsal als auch in ventral migrierenden corticalen Interneuronen exprimiert wird, was den gegenwärtigen Kenntnisstand erweitern würde. Tangential migrierende corticale Interneurone wurden zuerst mit Ursprung in der MGE entdeckt, was

Lhx6 zu einem Marker für Interneurone aus der MGE machte (Lavdas et al., 1999, Fogarty et al., 2007). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch die POA eine Quelle für corticale Interneurone darstellt (Gelman et al., 2009, Hirata et al., 2009, Zimmer et al., 2011) und auch dort Lhx6-exprimierende corticale Interneurone geboren werden.

## 5.2. Die vielfältigen Funktionen des Eph/Ephrin-Systems während der Migration corticaler Interneurone

In der Literatur werden Mitglieder der Eph/Ephrin-Familie als Signalmoleküle beschrieben, welche hauptsächlich durch repulsive Interaktionen die Migration corticaler Interneurone regulieren. Zum Beispiel zeigten Zimmer et al. (2008), dass Calbindin-exprimierende Interneurone des dorsalen Migrationsweges, welche aus der MGE stammen, EphA4-Rezeptoren tragen und durch die Ephrin-A5 exprimierenden Zellen der Ventrikularzone der ganglionischen Eminenzen abgestoßen werden. Dadurch werden die Interneurone zum einen aus der Ventrikularzone herausgetrieben, in der sie geboren wurden und zum anderen bildet die VZ damit eine repulsive Flanke, die durch die Begrenzung permissiver Korridore zur korrekten Wegfindung migrierender corticaler Interneurone beitragen kann. Ebenso konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das im Striatum exprimierte Ephrin-A3 repulsiv auf diese DMS-Zellen wirkt und so verhindert, dass diese Neurone in dieses Nicht-Zielgebiet eindringen (Rudolph et al., 2010). Die repulsive Wirkung von Ephrin-A3 und Ephrin-A5 wird dabei in beiden Fällen über EphA4-*forward signaling* vermittelt und kanalisiert die MGE-Neurone in den dorsalen Migrationsstrom Richtung Cortex. Des Weiteren belegten die vorliegenden *in vitro*-Daten, dass Ephrin-B3 exprimierende Interneurone aus der POA einen ventralen Migrationsweg Richtung Cortex nehmen und dabei vom dorsalen Strom durch repulsives bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-*signaling* räumlich getrennt werden.

Neben dieser konventionellen Rolle von EphA4 als Vermittler für repulsive Lenkungsmoleküle wurde kürzlich auch eine zuvor unbekannte Funktion dieses Faktors gefunden. Steinecke (2013) konnten zeigen, dass EphA4 *in vitro* und *in vivo* einen zelltypspezifischen motogenen Effekt auf migrierende Interneurone aus der MGE ausübt. Diese Wirkung wird über EphA4-/Ephrin-A2-*reverse signaling* vermittelt, wobei EphA4 als Ligand und Ephrin-A2 als vermittelnder Rezeptor auf den migrierenden Zellen fungiert. Bis dahin war EphA4 nur dafür bekannt, Interneurone aus der MGE über *forward signaling* zum Cortex zu lenken. Nun zeigte es für denselben Zelltyp in *trans* über *reverse signaling* einen völlig neuen – motogenen – Effekt. Damit kann EphA4 in einer migrierenden Zelle zwei verschiedene Wirkungen auslösen. Zum einen vermittelt es direkt eine Repulsion der Zelle über klassisches *forward signaling*. Zum anderen kann EphA4 gleichzeitig als auf Nachbarzellen lokalisierter Ligand in derselben Zelle einen positiven motogenen Effekt auslösen. Dieser wird über Ephrin-A2-*reverse signaling* vermittelt.

Auch B-Ephrine sind an der Regulation der tangentialen Migration beteiligt. *Reverse signaling* über Ephrin-B3, exprimiert auf corticalen Interneuronen des VMS, ist Teil der oben beschriebenen Segregation der zwei Migrationsströme. Darüber hinaus vermittelt es aber auch die repulsive Wirkung

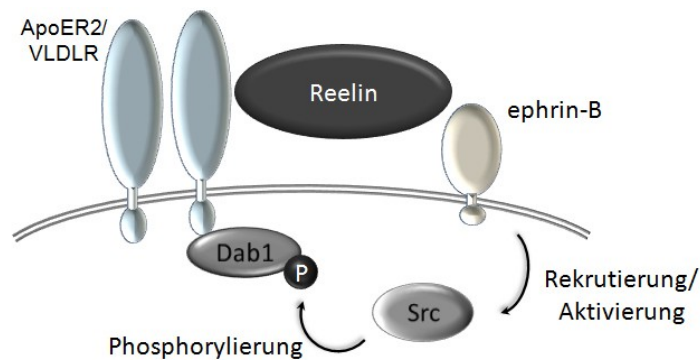
von EphB1 im Striatum, wodurch dieses Gebiet von den corticalen Neuronen des ventralen Migrationsweges gemieden wird. Gleichzeitig ergaben die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass Isl-1-positive striatale Zellen durch das gleiche EphB1-/Ephrin-B3-*reverse signaling* in ihrem Zielgebiet, dem Striatum, gestoppt werden. Damit werden zwei verschiedene Wirkungen (repulsiv und motogen) durch ein und denselben Faktor, Ephrin-B3, vermittelt. Sie wirken jedoch auf zwei verschiedene Zellpopulationen: striatale und corticale Interneurone. Beide Effekte gehen nach EphB1-Bindung über Ephrin-B3-*reverse signaling* vonstatten. Dabei werden die verschiedenen Wirkungen durch Unterschiede innerhalb der Ephrin-B3-*reverse signaling*-Signalkaskaden vermittelt, welche die Level an phosphoryliertem Src und FAK entgegengesetzt regulieren. Ähnlich wie die durch EphA4 ausgelösten Reaktionen, ist der eine durch Ephrin-B3 vermittelte Effekt lenkend, während der andere motogenen Charakter für die Zellen hat. Im Gegensatz zu der migrationsfördernden Wirkung von EphA4 auf DMS-Interneurone, wurde hier jedoch ein negativer motogener Effekt von EphB1 auf migrierende Isl-1-positive striatale Zellen gefunden. Dies stellt eine völlig neue Funktion als Stopp-Faktor für ein Mitglied des Eph/Ephrin-Systems dar, welche für diese Proteinfamilie zuvor nicht beschrieben wurde.

### 5.3. Stopp-Faktoren beenden die neuronale Migration

Verschiedene *in vitro* Experimente dieser Arbeit haben ergeben, dass das im Striatum exprimierte EphB1 tangential migrierende striatale Zellen anhalten lässt, nach dem diese ihr Zielgebiet erreicht haben. Damit wurde eine neue Funktion für einen Vertreter des Eph/Ephrin-Systems gefunden, da Stopp-Signale aus der Literatur bisher nur für andere Signalsysteme bekannt sind. So wird zum Beispiel GABA neben seiner Funktion als Neurotransmitter auch eine Wirkung als Stopp-Faktor für tangential migrierende corticale Interneurone zugeschrieben, nachdem diese ihre korrekte Position im Cortex erreicht haben. Bortone and Polleux (2009) konnten zeigen, dass extrazelluläres GABA während früher Entwicklungsstadien migrierende Interneurone depolarisiert, was motogen auf diese Zellen wirkt und damit deren Motilität steigert. Nach Erreichen des corticalen Zielgebietes wird dann die Expression des Kalium-Chlorid-Cotransporters KCC2 hochreguliert. Dies führt zu einer Umkehr des GABA-Effektes, von Depolarisation zu Hyperpolarisation, wodurch spontane Kalziumeinströme durch spannungsgesteuerte Kanäle in migrierenden Interneuronen verhindert werden. Infolgedessen erhöhen sich die Zeiten, in denen die Neurone pausieren, wodurch deren Migration letztendlich zum Stillstand kommt. Dieser Mechanismus setzt eine Änderung der Eigenschaften der migrierenden Zellen voraus. Damit der Stopp zustande kommt, muss KCC2 hochreguliert werden, um die Antwort auf GABA als Stopp-Signal zu induzieren. Obwohl also GABA ubiquitär vorhanden ist, wirkt es erst dann als Stopp-Faktor, wenn die Zellen ihre corticale Zielregion erreicht haben und aufgrund dessen ihre KCC2-Rezeptoren hochregulieren. Im Gegensatz dazu zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass Isl-1<sup>+</sup> striatale Zellen während der gesamten Zeit ihrer Migration Ephrin-B3-Liganden tragen, welche ihren Stopp-Faktor EphB1 erkennen können. Nach der Bindung von EphB1 sinkt das pSrc-Level in diesen Zellen, wodurch deren Migration beendet wird und sie in ihrem Zielgebiet gehalten werden. Somit halten Isl-1-exprimierende striatale Zellen aufgrund von Änderungen ihrer Umgebung

an und nicht infolge von Veränderungen ihrer Proteinzusammensetzung während ihrer Wanderung. Aus diesem Grund muss die Expression von EphB1 auf ein begrenztes Gebiet, das Striatum, beschränkt werden, da dessen Zielzellen nicht ihre Eigenschaften verändern, sondern dann anhalten, wenn sie diesen Faktor in ihrer sich verändernden Umgebung detektieren.

Ein weiteres Beispiel für einen Stopp-Faktor ist das Glykoprotein Reelin, welches radial migrierende corticale Projektionsneurone anhalten lässt. Die Zellen wandern dabei entlang radialer Gliazellen, die den Neuronen als Gerüst dienen. Da Reelin diese Zellmigration beeinflusst, spielt es eine große Rolle bei der korrekten Entstehung der Cortexschichten (Tissir and Goffinet, 2003, Frotscher, 2010, Lakatosova and Ostatnikova, 2012). In *reeler*-Mäusen, denen das Reelin-Protein fehlt, ist die geordnete Positionierung der neocorticalen Zellen nach dem *inside-out*-Prinzip während der Entwicklung gestört, was in einer Umkehr der corticalen Schichtung resultiert (Caviness and Sidman, 1973). Reelin übt seine Funktion durch Bindung an seine Rezeptoren VLDLR (*very low density lipoprotein receptor*) und ApoER2 (*apolipoprotein E receptor 2*) aus, wodurch die Phosphorylierung des Adaptorproteins *Disabled-1* (Dab1) (D'Arcangelo et al., 1999, Howell et al., 1999) durch Src-Familie-Kinasen induziert wird (Arnaud et al., 2003, Bock and Herz, 2003). Dabei ist diese Phosphorylierung von Dab1 für das Reelin-*signaling* unabdingbar, da Dab1 für das Ablösen der Neurone von der radialen Glia erforderlich ist, wodurch die neuronale Migration beendet wird (Sanada et al., 2004). Folglich führte eine Inhibition der Dab1-Phosphorylierung durch PP2-Behandlung in corticalen Schnittkulturen zur Ausbildung eines *reeler*-Phänotypes (Jossin et al., 2003, Zhao and Frotscher, 2010). Erst kürzlich konnten Sentürk et al. (2011) in diesem Zusammenhang zeigen, dass Ephrin-B-Liganden, vor allem Ephrin-B3, eine entscheidende Rolle im Reelin-Signalweg spielen und dabei ein Bindeglied zwischen Reelin und Src darstellen, welches zur Aktivierung von Dab1 benötigt wird. Dabei bindet Reelin nicht nur an seine Rezeptoren VLDLR und ApoER2, sondern auch an die extrazelluläre Domäne von Ephrin-B-Liganden. Werden diese Ephrin-Bs durch EphB-Rezeptoren aktiviert, so rekrutieren und aktivieren sie dann Src-Kinasen, welche wiederum Dab1 phosphorylieren, das mit den Reelin-Rezeptoren an der Membran assoziiert ist (Abb. 32). Deshalb führte der Verlust der Ephrin-B-Funktion zu einer Beeinträchtigung der Reelin-vermittelten Dab1-Phosphorylierung. Umgekehrt konnte die Phosphorylierung von Dab1 in *reeler*-Neuronen lediglich durch die Aktivierung von Ephrin-B-Liganden mit Eph-Rezeptoren wiedererlangt werden. Somit konnten Migrationsdefekte, die normalerweise in einem *reeler*-Phänotyp resultieren würden, in organotypischen Reelin<sup>-/-</sup>-Schnittkulturen durch Aktivierung des Ephrin-B-*signalings* verhindert werden (Sentürk et al., 2011).



**Abb. 32: Modellhafte Darstellung der Funktion von Ephrin-B-Liganden im Reelin-Signaltransduktionsweg.** Reelin bindet sowohl an seine Rezeptoren als auch an Ephrin-Bs, welche daraufhin Src-Kinasen rekrutieren und aktivieren. Diese wiederum phosphorylieren Dab1, welches mit den Reelin-Rezeptoren assoziiert ist. Nach Sentürk et al., 2011.

Reelin wird in erster Linie von Cajal-Retzius-Zellen in der Marginalzone des Cortex sezerniert (D'Arcangelo et al., 1995, Ogawa et al., 1995). Daher geht man davon aus, dass Reelin in einem Gradienten über dem sich entwickelnden Cortex vorliegt, wodurch es in Abhängigkeit von seiner Konzentration verschiedene Effekte auf die Zellen ausübt. Eine Hypothese besagt dabei, dass ein niedriger Reelin-Spiegel als ein attraktiver Faktor für die Neurone dienen soll, damit diese zum oberen Ende der corticalen Platte migrieren. Somit wandern in der sich entwickelnden corticalen Platte neu geborene Neurone an den zuvor entstandenen vorbei, wodurch sich die corticale Schichtenbildung nach dem *inside-out*-Prinzip vollzieht (Zhao and Frotscher, 2010). Liegt Reelin dagegen in hohen Konzentrationen vor, wie dies in der Marginalzone der Fall ist, so dient es als ein Stopp-Signal für die radial migrierenden Neurone, da es die Ablösung der Zellen von der radialen Glia auslöst. Diese These wird durch funktionelle Studien gestützt, in denen Neurone nach Zugabe von exogenem Reelin zum Stillstand kommen und sich von den radialen Gliazellen lösen (Dulabon et al., 2000, Cooper, 2008). Da diese Vorgänge in der *reeler*-Maus gestört sind, werden aufsteigende Zellen nicht durch Reelin angehalten und erreichen so die Pia. Später generierte Neurone können somit nur noch unter den früher geborenen Zellen zu liegen kommen, wodurch sich die corticale Schichtung umkehrt (zusammengefasst in Frotscher, 1997, Honda et al., 2011).

#### 5.4. Die Wirkung von EphB1 auf migrierende Neurone wird über FAK/Src-signaling vermittelt

Die *in vitro*-Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl Isl-1-positive als auch Isl-1-negative Zellen Ephrin-B3 auf ihrer Oberfläche tragen, jedoch in unterschiedlicher Weise auf das Signalmolekül EphB1 reagieren. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die unterscheidenden Mechanismen *downstream* in der Signaltransduktionskaskade liegen. Es zeigte sich, dass die Src-Kinase für die korrekte Funktion von EphB1 als ein Stopp- oder ein repulsives Signal entscheidend ist. Wird der grundlegend hohe Gehalt von an Position Tyr418 phosphoryliertem Src in striatalen Zellen durch Dephosphorylierung reduziert, da EphB1 gebunden wird, so kommt die Migration dieser Neurone zum Stillstand. Im Gegensatz dazu entscheidet die Aktivierung oder Inhibition von Src in corticalen Interneuronen über Repulsion oder Attraktion.

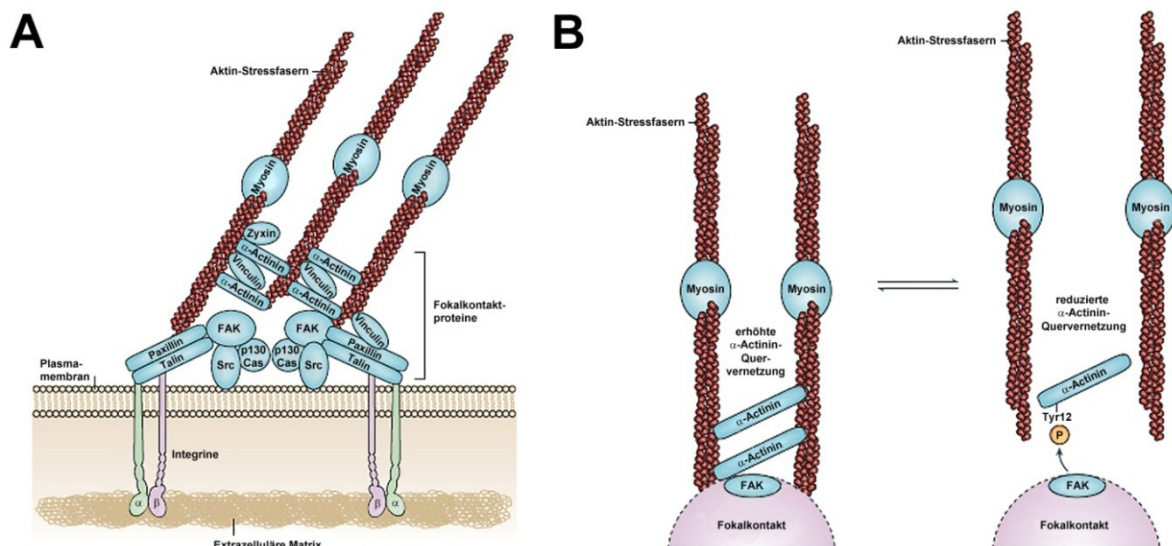
Ein wichtiger Interaktionspartner von Src ist die *focal adhäsion kinase* (FAK), welche Src zu einem FAK/Src-Signalkomplex rekrutiert, der die Phosphorylierung verschiedenster mit FAK assoziierter Proteine ermöglicht. Aufgrund seiner Beteiligung bei der Bildung dynamischer Fokalkomplexe beeinflusst FAK den Umbau von Aktin- und Mikrotubuli-Strukturen oder Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte und unterstützt somit die Migration von Zellen (zusammengefasst von Mitra et al., 2005). FAK reguliert die Kinase Src durch Phosphorylierung an Position Tyr418, welche innerhalb der Kinasedomäne liegt (Wu et al., 2008). Die Phosphorylierung dieser Aminosäure führt zur maximalen Aktivierung von Src.

#### 5.4.1. Die Rolle von FAK und Src bei Zell-ECM-Interaktionen und Migration

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an Src, welches am Tyr418-Rest phosphoryliert wurde, in striatalen und corticalen Interneuronen nach Bindung an EphB1 unterschiedlich reguliert wird. Isl-1-positive striatale Zellen haben dabei ein allgemein höheres pSrc-Level als corticale Interneurone, was vermuten lässt, dass FAK in diesen Zellen auch eine erhöhte Aktivität aufweist. Im Einklang mit dieser Hypothese ergab die Messung von Fluoreszenzaktivitäten des pFAK-Signals von Isl-1-positiven und -negativen Neuronen, dass der Gehalt an aktiviertem phosphoryliertem FAK verglichen mit corticalen Interneuronen leicht erhöht war (Daten nicht gezeigt). Nach der Bindung von EphB1-Fc konnten jedoch keine oder nur sehr schwache Kollokalisierungen zwischen pSrc oder pFAK und EphB1-Bindungsstellen in Isl-1<sup>+</sup> striatalen Zellen gefunden werden (Abb. 25D, D', H, H', L, L'; offene Pfeilspitzen), was darauf schließen lässt, dass die Bindung von EphB1 an seine Liganden über einen noch unbekannten Mechanismus zur Dephosphorylierung des FAK/Src-Komplexes führt. Diese Abnahme der Kinaseaktivitäten beendet die Migration striataler Zellen.

In der Literatur lassen sich mehrere Belege finden, dass eine Reduktion der Aktivität von FAK oder Src die Migration von Zellen negativ beeinflussen kann, was konsistent zu dem hier beobachteten Stopp-Effekt ist. Die grundlegenden Vorgänge der Zellmigration basieren auf der hochdynamischen Abfolge von drei Prozessen: der Adhäsion der Zellen an das Substrat, dem Umbau des Aktin-Zytoskeletts und dem Ablösen der Zellen vom Substrat. Bereits der Name von FAK deutet darauf hin, dass diese Kinase eine große Rolle bei der Ausbildung fokaler Adhäsionskontakte spielt, welche zwischen der Extrazellulären Matrix (ECM), Integrinen und dem Zytoskelett der Zelle aufgebaut werden und die Adhäsion der Zellen an das Substrat vermitteln. Die Rekrutierung von FAK zu diesen dynamischen Fokalkontakten erfolgt dabei über die Integrin-bindenden Proteine Paxillin und Talin, welche auch Vinculin binden. Letzteres vernetzt zusammen mit dem Zytoskelettprotein  $\alpha$ -Actinin die Aktin-Myosin-Stressfasern und verknüpft sie mit den Fokalkontakten (zusammengefasst von Mitra et al., 2005; Abb. 33A). Dabei vermindert die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Actinin durch FAK die Quervernetzung der Stressfasern wieder und löst sie von den Kontakten. Damit trägt FAK zum dynamischen Auf- und Abbau dieser Adhäsionsstellen bei (*adhesion turnover*), welche eine Voraussetzung für die Motilität von Zellen ist (Izaguirre et al., 2001, Brakebusch and Fassler, 2003; Abb. 33B). Teil der Fokalkontakte ist auch die Membran-assoziierte Tyrosin-Kinase Src, welche mit FAK einen Signalkomplex bildet und so vermutlich das *signaling* in der Zelle auslöst (Mitra et al., 2005).





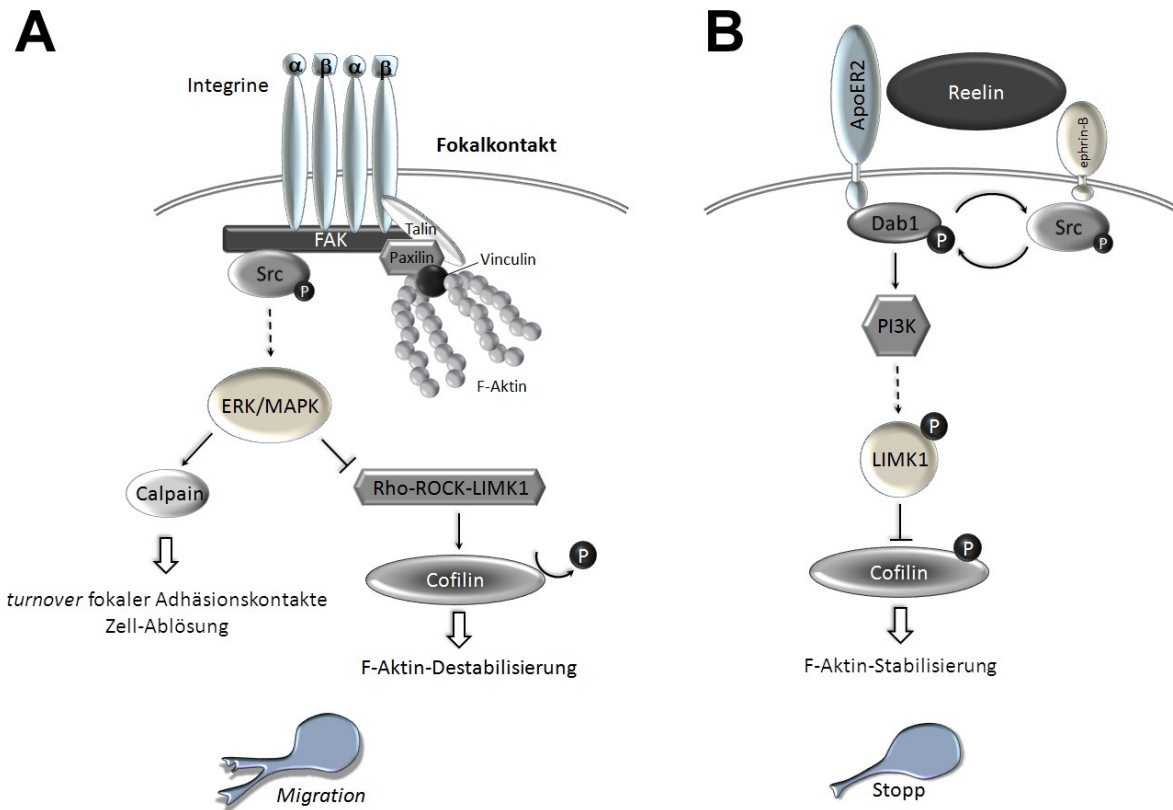
**Abb. 33: Schematische Darstellung der molekularen Struktur dynamischer fokaler Adhäsionskontakte**, welche zwischen der Extrazellulären Matrix, Integrinen und dem Zytoskelett der Zelle aufgebaut werden. An der Ausbildung dieser Kontakte sind unter anderem die Kinasen FAK und Src beteiligt (**A**), wobei FAK eine entscheidende Rolle bei der Dynamik der Fokalkontakte spielt (**B**), da es unter anderem über die Phosphorylierung von  $\alpha$ -Actinin die Quervernetzung des Aktin-Myosin-Zytoskeletts reguliert. Modifiziert nach Mitra et al., 2005.

Studien mit FAK-Knockout-Mäusen ergaben in diesem Zusammenhang, dass die Migration von FAK-Null-Fibroblasten gestört ist. Dies ist zurückzuführen auf die vermehrte Ausbildung von Fokalkontakten, da Integrin-basierte Adhäsionsstellen am Substrat nicht mehr abgebaut werden. Somit ist die reguläre Fluktuation der ausgebildeten Kontakte gestört, wodurch mehr stabile fokale Adhäsionskontakte entstehen, was die Motilität der Zellen stark herabsetzt (Ilic et al., 1995, Webb et al., 2004). Demnach ist FAK für die exakte Migration von Zellen notwendig und eine fehlende FAK-Aktivität, wie in FAK-Knockout-Zellen oder durch Dephosphorylierung verhindert die Zellmigration. Darüber hinaus fanden Klinghoffer et al. (1999), dass Fibroblasten aus Mäusen mit fehlender Expression der Src-Familie-Vertreter Src, Yes und Fyn den gleichen Phänotyp verringerter Motilität und Ausbreitung aufweisen. Dies lässt darauf schließen, dass sowohl FAK als auch Src entscheidend für die Migration striataler Neurone sind und einen FAK/Src-Signalkomplex bilden. Wird eines der beiden Proteine, oder beide, durch Dephosphorylierung via EphB1-Bindung oder, wie in den Experimenten der vorliegenden Arbeit, durch Blockierung mit Hilfe eines Inhibitors deaktiviert, so kommt die Migration dieser Zellen damit zum Stillstand.

In der Regulation der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts wird Cofilin eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Dabei ist das F-Aktin an der Vorderseite der Zelle einem ständigen organisierten Auf- und Abbau unterworfen, wodurch der Zellfortsatz bewegt wird (Pollard and Borisy, 2003). Cofilin liegt membranständig im *leading*-Fortsatz migrierender Zellen vor und bindet dort an F-Aktin-Filamente, deren Abbau es fördert. Es wirkt somit destabilisierend auf das Zytoskelett und fördert so die Bildung neuer Lamellipodien (Jovceva et al., 2007, Kiuchi et al., 2007) und die gerichtete Zellmigration (Dawe et al., 2003, Ghosh et al., 2004). Wird Cofilin durch die LIM Kinase 1 (LIMK1) an Serin3 phosphoryliert, wird das Protein damit deaktiviert. Dadurch wird die Aktin-Bindung und -Depolymerisierung verhindert, wodurch das Zytoskelett der Zelle stabilisiert und somit die Migration beendet wird (Moriyama et al., 1996, Nagaoka et al., 1996).

Dabei gibt es abhängig vom Zelltyp verschiedene Signalwege, welche die Aktivität von Cofilin und damit die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts regulieren. Interessanterweise kann dabei die Aktivität der involvierten Src-Kinasen gegenteilige Auswirkungen haben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in striatalen Zellen eine Reduktion der Src-Aktivität zum Stopp der Zellen führte. Für NRK-Zellen (*normal rat kidney epithelial cells*) wurde ein Mechanismus beschrieben, bei dem eine Verminderung der Src-Aktivität zum Migrationsstopp führt (Abb. 34A). Dabei blockiert Src, welches durch FAK in Integrin-basierten Fokalkomplexen aktiviert wurde, den Rho-ROCK-LIMK1-Signalweg, der normalerweise in einer Phosphorylierung von Cofilin resultiert. Somit führt die Aktivität von Src in diesem Zelltyp zur Abnahme des pCofilin-Levels und damit zur Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts und erhöhter Motilität (Pawlak and Helfman, 2002). Dementsprechend wurden Tumore mit hoher Src-Aktivität aufgrund ihrer hohen Invasivität als besonders maligne beschrieben (Frame, 2002). Wird die Src-Aktivität in diesem Modell gesenkt, so wird der Rho-ROCK-LIMK1-Signalweg aktiv, welcher zur Bildung von pCofilin führt und so über stabilisiertes F-Aktin zum Motilitätsstopp. Dabei wird der Rho-ROCK-Signalweg über die Tyrosinkinasen ERK/MAPK reguliert, welche über Calpain auch Einfluss auf die Integrin-Aktivierung ausüben und damit am *turnover* der fokalen Adhäsionskontakte beteiligt sind. Sie unterstützen das Lösen von Zell-Substrat-Interaktionen und somit die Motilität (Carragher and Frame, 2004). Eine Reduktion der Src-Aktivität würde diesen Signalweg inhibieren und zum Stopp der Zellen führen.

Auch in radial migrierenden Projektionsneuronen wird die Motilität der Zellen über Cofilin in Abhängigkeit von Src-Kinasen reguliert, jedoch in entgegengesetzter Weise (Abb. 34B). Cofilin wird durch die LIM Kinase 1 phosphoryliert, was zur Stabilisierung des Zytoskeletts und damit zum Migrationsstopp führt. In diesem Zusammenhang wurde eine Beteiligung des Reelin-*signalings* bei der Cofilin-Phosphorylierung diskutiert, über welche Reelin seine oben beschriebene Wirkung als Stopp-Signal vermitteln soll. Dabei erhöht Reelin in Verbindung mit ApoER2, Dab1, SFKs und der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) die Aktivität von LIMK1 und damit die Phosphorylierung von Cofilin, wodurch das Protein inaktiviert wird. Dadurch wird das Aktin-Zytoskelett stabilisiert und die Zellmotilität unterbunden. Dieser Prozess ist abhängig von der Aktivität von Src-Kinasen, da eine Behandlung mit dem SFK-Inhibitor PP2 eine starke Abnahme der Phosphorylierungslevel von LIMK1 und Cofilin bewirkte (Chai et al., 2009). Somit führt aktives Src in radial migrierenden Projektionsneuronen über Reelin und den PI3K-Signalweg zur Aktivierung der LIMK1, wodurch Cofilin phosphoryliert, Aktin stabilisiert und die Motilität der Zelle herabgesetzt wird. Eine Reduktion der Src-Aktivität durch PP2 würde dementsprechend in erhöhter Zellmotilität resultieren.



**Abb. 34: Die Src-abhängige Regulation der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts über Cofilin.** Die Aktivität der involvierten Src-Kinasen kann dabei gegenteilige Auswirkungen haben, die zu erhöhter **(A)** oder verringerter Motilität **(B)** der Zellen führen. Cofilin wirkt destabilisierend auf das Zytoskelett und fördert so die Motilität der Zellen. Phosphorylierung durch die LIM Kinase 1 (LIMK1) inaktiviert Cofilin und führt damit zur Aktin-Stabilisierung. **A**, Aktives Src als Bestandteil von Fokalkomplexen inhibiert über den ERK/MAPK-Rho-ROCK-Signalweg die LIM Kinase 1, wodurch Cofilin aktiviert wird. Zusammen mit der ERK/MAPK-basierten Aktivierung von Calpain fördert dies die Migration der Zellen. Inhibition von pSrc führt demnach zum Stopp der Zellen. **B**, Reelin induziert eine LIMK1-abhängige Deaktivierung von Cofilin, was zur Stabilisierung des Zytoskeletts und damit zum Stopp der Zelle führt. Eine Behandlung mit Src-Inhibitoren würde demnach zur Dephosphorylierung von Cofilin und damit zu erhöhter Zellmotilität führen. Nach Carragher and Frame (2004) **(A)** und Chai et al. (2009) **(B)**.

In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass die Fokalkontakte nicht nur der Anheftung der Zellen an das Substrat oder die Extrazelluläre Matrix dienen, sondern auch die Übermittlung externer Signale in das Zellinnere ermöglichen. Über diese können z.B. Signalmoleküle wie die Ephrine die Anheftung oder die Migration von Zellen beeinflussen, welche Folgen von Integrin-vermittelten Aktin- und Mikrotubuli-Strukturveränderungen sind. Ein solcher Mechanismus, an dem Vertreter des Ephrin-B-Systems beteiligt sind und der zu einer Verstärkung der Integrin-Funktion führte, wurde für mikrovaskuläre Endothelzellen beschrieben. Dabei phosphoryliert und aktiviert EphB1-Fc in diesen Zellen Ephrin-B1, welches als funktionaler Rezeptor eine „outside-in“ Signaltransduktion vermittelt, was eine Integrin-vermittelte erhöhte Adhäsion der Endothelzellen an das Substrat bewirkt (Huynh-Do et al., 2002). Eine ähnliche Korrelation zwischen EphB1 und Integrin-basierten fokalen Adhäsionskontakten, an deren Ausbildung und Regulation auch FAK und Src beteiligt sind und über ERK/MAPK und den Rho-ROCK-LIMK1-Signalweg die Entstehung stabiler Adhäsionskontakte fördern könnten, ließe sich auch in Verbindung mit Ephrin-B3 in striatalen Neuronen denken.

#### 5.4.2. Der lenkende Einfluss von FAK und Src auf migratorische Prozesse

Im Gegensatz zu striatalen Zellen führt die Bindung von EphB1 in corticalen Interneuronen zur Phosphorylierung von Src und FAK und damit zu deren Aktivierung (Abb. 25C, C', G, G'; K, K'; Pfeilspitzen), worüber der repulsive Effekt vermittelt wird, den EphB1 in dieser Zellpopulation auslöst. Wird die Funktion von Src oder FAK in diesen Zellen blockiert, so kehrt sich der EphB1-Effekt in Attraktion bzw. erhöhte Adhäsion um, wobei das Migrationsvermögen der Interneurone unbeeinflusst von dieser Inhibition bleibt. Somit scheint der Aktivierungsstatus des FAK/Src-Komplexes im *downstream-signalling* der Ephrin-B-Liganden bei corticalen Interneuronen in die EphB1-vermittelte Regulation von Repulsion versus Attraktion involviert zu sein. Zimmer et al. (2007) haben in diesem Zusammenhang bereits gezeigt, dass differentielle Antworten der gleichen Zellpopulation auf einen Vertreter der Eph/Ephrin-Familie abhängig von der Aktivität von Src-Familie-Kinasen sein können. Eine Blockierung der SFKs mittels PP2 *in vitro* konvertierte in diesem Fall eine Ephrin-A5-induzierte Repulsion corticaler Neurone in Attraktion.

Damit entscheidet letztendlich die unterschiedliche Regulation des pSrc- und pFAK-Gehaltes über Stopp in striatalen Zellen bzw. Repulsion in corticalen Interneuronen. Schon Falk et al. (2005) konnten zeigen, dass die FAK/Src-Signalkaskade die duale Aktivität eines Lenkungsfaktors vermitteln kann. Während der Entwicklung der Anterioren Kommissur (AC) tragen selektive attraktive und repulsive Reaktionen der Axone auf Sema3B, welche durch FAK/Src-*signaling* vermittelt werden, zur Ausbildung dieses Axontraktes bei. Dabei entscheidet in diesem Fall nicht der Phosphorylierungsstatus, sondern die Einbindung des FAK/Src-Komplexes in die Zellmembran über die Wirkung dieses Lenkungsfaktors. Während Src in beiden Axontypen phosphoryliert vorlag, induzierte Sema3B jedoch nur in anterioren AC-Axonon eine Rekrutierung der FAK/Src-Komplexe zur Membran, wodurch Sema3B eine attraktive Wirkung auf diese Axone ausübte. Im Gegensatz dazu konnten keine solchen Komplexe in posterioren AC-Axonon gefunden werden, auf die Sema3B repulsiv wirkt.

Sowohl migrierende Interneurone als auch auswachsende Axone werden demnach durch Adhäsions- und Signalmoleküle auf ihrem Weg geleitet. Dabei stellt FAK ein direktes Bindeglied zwischen Adhäsionsstellen und intrazellulären Signalwegen dar (Mitra et al., 2005, Parsons et al., 2007). In Wachstumskegeln auswachsender Axone wurde eine Beteiligung des FAK/Src-*signalings* sowohl für attraktive als auch repulsive Reaktionen beschrieben (Bechara et al., 2008, Chacon and Fazzari, 2011, Myers and Gomez, 2011). Wachstumskegel von Axonen bestehen aus Mikrotubuli-Filamenten, sowie aus hochdynamischen Aktin-reichen Lamellipodien und Filopodien. Lamellipodien stellen ein Netzwerk kurzer Aktin-Filamente dar und stülpen neue Membranbereiche aus. Filopodien bestehen dagegen aus langen Bündeln von Aktin-Filamenten. Sie sind am Abtasten der Umgebung und an der Lenkung des Wachstumskegels beteiligt. Die gerichtete Bewegung eines Wachstumskegels ist verbunden mit dem Ausstülpen der Membran an der Vorderseite und dem Zurückziehen an der Rückseite des Fortsatzes, was mittels bidirektionaler Interaktionen zwischen Aktin- und Mikrotubuli-Filamenten reguliert wird. Wächst der Wachstumskegel auf einen attraktiven Faktor zu, bzw. von einem repulsiven Faktor weg, so werden gezielt Lamellipodien in Richtung des Chemoattraktants ausgebildet, sowie die Mikrotubuli-Filamente an dieser Seite des Wachstumskegels stabilisiert oder weiter aufgebaut. Umgekehrt werden Lamellipodien auf der Seite eines Chemo-

repellents zurückgezogen, sowie Mikrotubuli von der Peripherie mittels Depolymerasen und Mikrotubuli-schneidenden Enzymen entfernt. Durch diese Abläufe ändert das Axon seine Wachstumsrichtung. Dabei ist die Ausstülpung neuer Lamelli- und Filopodien in Wachstumsrichtung auch mit der Ausbildung neuer fokaler Adhäsionskontakte an diesen Stellen verbunden, ebenso wie mit deren Abbau an der eingezogenen Rückseite (zusammengefasst in Vitriol and Zheng, 2012). Diese Vorgänge sind wie oben beschrieben eng mit der Aktivität des FAK/Src-*signalings* verknüpft.

Ändert ein auswachsendes Axon aufgrund von Lenkungs Faktoren seine Richtung, so wird der bestehende Wachstumskegel also durch asymmetrische Reorganisation des Aktin-Mikrotubuli-Zytoskeletts umgebaut, wodurch sich der Fortsatz in eine neue Wuchsrichtung umorientiert. Migrierende Interneurone werden dagegen auf andere Art und Weise gelenkt. Interneurone bilden einen *leading*-Fortsatz in Migrationsrichtung aus, in den der Zellkern nachgezogen wird, wodurch die Nettobewegung der Zelle erfolgt (Marin et al., 2010). Dieser *leading*-Fortsatz verzweigt sich als Teil des migratorischen Zyklus. Der Nukleus wird dann in einen der beiden Fortsätze gezogen, während der andere Fortsatz wieder eingezogen wird. Dabei werden neue *leading*-Fortsätze in Richtung eines Chemoattraktants ausgebildet und stabilisiert, bzw. sind von einem Chemorepellent weggerichtet (Bellion et al., 2005, Ward et al., 2005, Kappeler et al., 2006, Metin et al., 2006, Martini et al., 2009). In diesem Zusammenhang ist auch der Winkel, in dem Bifurkationen gebildet werden, entscheidend. Er bestimmt die möglichen Migrationsrichtungen der Zelle. Migriert die Zelle geradeaus, so sind die Verzweigungswinkel relativ klein und der Nukleus wird zufällig in einen der beiden Fortsätze gezogen. Bei der durch Lenkungs Faktoren beeinflussten gerichteten Migration verzweigt sich der *leading*-Fortsatz dagegen in einem großen Winkel. Dabei wird die neue Verzweigung auf einen Chemoattraktant ausgerichtet, bzw. von einem Chemorepellent weggerichtet und stabilisiert. In diese wird dann auch der Nukleus gezogen. Somit wird über die dynamische Regulation des Aktin-Zytoskeletts, welche zur asymmetrischen und gerichteten Verstärkung eines Fortsatzes führt, Chemotaxis vermittelt und die Richtung der Migration bestimmt. Anders als bei der Dynamik des axonalen Wachstumskegels werden dabei jedoch nicht bestehende Fortsätze umorientiert, sondern fortwährend neue Fortsätze ausgebildet. Dadurch kann die Zelle die Präsenz unterschiedlicher Lenkungsmoleküle über verschiedene auseinanderstrebende Zellfortsätze zusammenfassen und verarbeiten, wodurch eine große Region vor der Zelle abgetastet werden kann, bevor eine Migrationsrichtung ausgewählt wird. Zudem kann so, auch in Abhängigkeit von der Größe des Verzweigungswinkels, die Migrationsrichtung schneller geändert werden (Kakita and Goldman, 1999, Metin et al., 2006, Martini et al., 2009, Marin et al., 2010).

Dies würde auch implizieren, dass sich in corticalen Interneuronen nach Inhibition von Src die Wirkung von EphB1 nicht von Repulsion nach Attraktion umkehrt. Vielmehr wird nur der Repulsionsvermittelnde Faktor ausgeschaltet, der dazu führt, dass *leading*-Fortsätze von einer EphB1-Quelle zurückgezogen werden, wodurch die Zellen die Richtung ändern und die EphB1-Fc-Streifen vermeiden. Nach der Inhibition von Src bleibt demnach nur die starke Eph/Ephrin-Bindung zurück. Dies führt im Vergleich zur Fc-Kontrolle zu erhöhter Adhäsion auf den EphB1-Fc-Streifen, was auf den ersten Blick wie Attraktion erscheint. Für eine wirkliche Attraktion müssten die Zellen nach obigem Modell jedoch vermehrt Bifurkationen in Richtung der EphB1-Quelle ausbilden und sich so aktiv auf

sie zu bewegen. Ob es sich bei dem Src-abhängigen Switch von Repulsion zu EphB1-Präferenz wirklich um Attraktion, oder um Adhäsion handelt, könnten z. B. *time lapse*-Studien klären.

MGE-Interneurone können auch noch eine andere Strategie des Richtungswechsels zeigen. Dabei kehren Zellen mit einfacherer bipolarer Morphologie ihre Polarität um. Dieses Verhalten wurde in organotypischen Schnittkulturen beobachtet, in denen tangential migrierende Interneurone ihre Migrationsrichtung umkehren konnten (Nadarajah and Parnavelas, 2002, Bellion et al., 2005). Dies wurde auch bei spät geborenen Pyramidenzellen gefunden, welche retrograd Richtung Ventrikel migrieren, bevor sie dann zurück zur corticalen Platte wandern (Noctor et al., 2004).

### 5.5. Redundanz von Lenkungsfaktoren oder Zelltyp-Spezifität?

In den verschiedenen Teilen des basalen Telencephalons entstehen unterschiedliche eigenständige Interneuronen-Subtypen, jeweils definiert durch einen spezifischen kombinatorischen Code intrinsischer Transkriptionsfaktoren (Butt et al., 2005, Flames et al., 2007, Gelman et al., 2009, Miyoshi et al., 2010). Sie werden in distinkten Domänen der proliferativen Zonen gebildet, welche sich durch ihre Genexpressionsmuster unterscheiden und aufgrund dessen jeweils eine eigene Zellpopulation hervorbringen. So kann man z.B. die MGE in fünf Subdomänen (pMGE1-5) aufteilen. Dabei werden in den ersten zwei proliferativen Domänen, der dorsalen MGE, vor allem SST<sup>+</sup> Interneurone geboren, während PV<sup>+</sup> Interneurone hauptsächlich aus der ventralen MGE (pMGE3-5) stammen (Flames et al., 2007, Fogarty et al., 2007, Wonders et al., 2008). Aber nicht nur der genetische Code und der Ort ihrer Entstehung, sondern auch der Zeitpunkt ihrer Geburt bestimmt den Neuronen-Typ. Es konnte gezeigt werden, dass die bekannten Interneuronen-Subtypen in einer bestimmten zeitlichen Abfolge generiert werden und somit auch durch den Zeitpunkt ihrer Entstehung definiert werden (Butt et al., 2005, Miyoshi et al., 2007). Zusätzlich können diese Transkriptionsfaktoren auch die Migration der Interneurone fördern, indem sie zum Beispiel dafür notwendige „Effektorgene“ aktivieren oder die Reifung und Ausdifferenzierung migrierender Zellen unterdrücken. So wird z.B. die Expression von PAK3 (*p-21-activated serine/threonine kinase 3*), welche das Axon- und Dendritenwachstum unterstützt, in migrierenden MGE-Zellen durch Dlx1/Dlx2 Transkriptionsfaktoren unterdrückt (Nobrega-Pereira et al., 2008).

Somit sind verschiedene Subtypen von Interneuronen bereits präspezifiziert, bevor sie zu migrieren beginnen. Es konnte gezeigt werden, dass sie zumindest teilweise aufgrund ihrer internen Programmierung unterschiedlichen Migrationsrouten folgen (Zimmer et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene bevorzugte Migration von MGE-Interneuronen entlang des DMS wurde bereits in mehreren Studien mittels homotypischer Transplantation (Zimmer et al., 2008, Rudolph et al., 2010, Zimmer et al., 2010), sowie mit Dil-markierten (Ghanem et al., 2007), oder GFP-transfizierten MGE-Zellen (Flames et al., 2004) bestätigt. Die MGE-Interneurone des dorsalen Migrationsstroms exprimieren hauptsächlich EphA4 und Neuropilin-1 (Nrp-1). Im Gegensatz dazu migrieren corticale Interneurone aus der POA ventral Richtung Cortex. Dabei wurde die POA erst vergleichsweise spät als Ursprungsort corticaler Interneurone beschrieben (Gelman et al., 2009, Hirata et al.,

2009). Hirata et al. (2009) konnten in einer Dbx1-lacZ-Mauslinie die Migration von POA-Interneuronen verfolgen, welche ventral zur Amygdala verlief. Sie wurde als POA-Amygdala-Migrationsstrom bezeichnet. Die hier und in Zimmer et al. (2011) gefundenen Daten lassen dabei darauf schließen, dass die POA neben Interneuronen für die Amygdala auch corticale Interneurone generiert, welche ventral im basalen Telencephalon migrieren. Sie exprimieren neben Ephrin-B3 auch den Interneuronen-Marker Nrp-2 (Marin et al., 2001, Nobrega-Pereira et al., 2008). Die striatale Anlage exprimiert mit Klasse-3-Semaphorinen, sowie Mitgliedern des Eph/Ephrin-Systems verschiedene Lenkungsfaktoren, die alle repulsiv auf corticale Interneurone wirken und dadurch verhindern, dass diese Neurone in das Striatum einwandern.

Eine Expression verschiedener Faktoren mit gleicher Funktion im selben Gebiet erscheint redundant. Aus evolutionsbiologischer Sicht erhöht solch eine Redundanz die Funktionsfähigkeit des Systems, da im Falle von Fehlentwicklungen die Funktion eines fehlenden Lenkungsfaktors durch einen anderen ersetzt werden kann. Aber dies trifft nur teilweise zu. Migrierende Zellen werden auf ihrem Weg *in vivo* mit einer Vielzahl von Lenkungsfaktoren konfrontiert. Alle diese Signale werden dabei von den Zellfortsätzen integriert. Dabei können sowohl einzelne Subtypen von Zellen zellspezifisch nur auf einzelne Faktoren reagieren, oder aber es treten additive oder sogar synergistische Wirkungen mehrerer Lenkungsfaktoren auf. Wirken unterschiedliche Faktoren unabhängig bzw. parallel voneinander, so können sich ihre Effekte addieren. Tritt zusätzlich eine Kopplung zwischen Signalwegen auf (*crosstalk*), so kann der Nettoeffekt größer sein als die Summe der Einzelwirkungen, wodurch verschiedene Faktoren synergistisch wirken können (Dudanova and Klein, 2013). Die corticalen Interneurone der verschiedenen Migrationsströme gehören unterschiedlichen Subtypen an und sind durch einen kombinatorischen Code aus über- und untergeordneten Transkriptionsfaktoren präspezifiziert. Diese bestimmen die Ausstattung mit Zellmarkern und Lenkungsfaktoren, die ihre Migration beeinflussen. Aus diesem Grund benutzen die Zellen unterschiedliche Systeme um das Striatum zu vermeiden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass repulsives EphB1/Ephrin-B3-*reverse signaling* corticale Interneurone aus der POA daran hindert in das Striatum einzudringen. Zusätzlich wurden für diese VMS-Zellen repulsive Sema3F-Wirkungen beschrieben, welche über deren Nrp-2-Liganden vermittelt werden, wodurch das Striatum auch vermieden wird (Marin et al., 2001). Andererseits werden dorsal migrierende MGE-Zellen durch Sema3A/Nrp-1-Interaktionen (Marin et al., 2001) abgestoßen, ebenso wie durch Ephrin-A3/EphA4-Wechselwirkungen (Rudolph et al., 2010). Somit vermeiden die Subtypen corticaler Interneurone, welche in zwei unterschiedlichen Regionen des basalen Telencephalons entstehen und in zwei distinkten Migrationsströmen migrieren, das Striatum aufgrund individueller Zelloberflächen-Rezeptoren. Demzufolge werden auch vielfältige Lenkungsfaktoren in diesem Gebiet exprimiert: zwei Mitglieder des Eph/Ephrin-Systems und zwei Typen Semaphorine. Letztere werden zusätzlich durch die Kombination mit CSPGs (*chondroitin sulfate carrying proteoglycans*) dabei noch in ihrer repulsiven Wirkung verstärkt (Zimmer et al., 2010).

Zudem gehören sogar innerhalb des gleichen Migrationsstromes die Zellen unterschiedlichen Populationen an, die verschiedene Sets von Rezeptoren für Lenkungsfaktoren besitzen und daher auf unterschiedliche Signale antworten. Zum Beispiel ergaben immunzytochemische Färbungen von



Einzelzellen unterschiedlicher Regionen des basalen Telencephalons, dass nur ca. 15 % der IMZ-Zellen, als Teil des VMS, Nrp-1 exprimieren und nur ca. 20 % Nrp-2. Dies bedeutet, dass nur ein relativ kleiner Prozentsatz der Neurone das Striatum aufgrund von Klasse-3-Semaphorinen vermeidet. Dagegen tragen fast alle Neurone dieser Region Ephrin-B3-Liganden (Zimmer et al., 2011). Und selbst wenn verschiedene Zellen die gleichen Faktoren exprimieren, so wie corticale und striatale Neurone Ephrin-B3, können sie noch immer in unterschiedlicher Weise auf das gleiche Signalmolekül, EphB1, reagieren, da Ephrin-B3 unterschiedliche Wirkungen vermittelt: Stopp für die eine Zellpopulation, Repulsion für die Andere.

Auch Studien von Le et al. (2007) unterstützen die Ansicht, dass unterschiedliche Interneuronen-Subtypen in verschiedenen Regionen geboren werden. Durch ihre spezifische Ausstattung mit Rezeptoren für Lenkungsfaktoren tragen sie zur räumlichen Trennung der zwei Migrationsströme DMS und VMS bei. Le et al. (2007) konnten zeigen, dass Dlx1/Dlx2 spezifisch die Transkription von Nrp-2 unterdrückt, welches von Interneuronen im VMS exprimiert wird. Dlx1 und Dlx2 werden von Interneuronen des DMS koexprimiert mit Nrp-1. Somit wird durch diese Faktoren in Nrp-1-tragenden Zellen die Expression von Nrp-2 unterdrückt, was zur Zuordnung der Zellen zu einem der beiden Migrationsströme beiträgt. Genauso besitzen auch nur MGE-Neurone EphA4-Rezeptoren, während ventral migrierende, POA-geborene Interneurone Ephrin-B3-Liganden exprimieren. Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-*signaling* zu einer kontaktvermittelten Segregation der beiden Migrationsströme führt. Dabei ist bereits bekannt, dass bidirektionale Eph/Ephrin-*reverse signaling*-Mechanismen zur Kompartimentierung verschiedener Gewebe führen können; so zum Beispiel bei der Organisation striataler Neurone zu Striosomen (Janis et al., 1999, Passante et al., 2008), oder bei der Ausbildung der Rhombomere während der Entwicklung des Metencephalons (Mellitzer et al., 1999, Xu et al., 1999).

Schon ein einziger *upstream*-Transkriptionsfaktor kann die Ausstattung einer Zelle verändern, in dem er die Expression verschiedener Gene und damit von Zellmarkern und Lenkungsfaktoren moduliert. So wird zum Beispiel Sip1, ein Transkriptionsfaktor, der in migrierenden corticalen Interneuronen aus der MGE exprimiert ist, für die korrekte Differenzierung dieser Zellen benötigt. In Sip1-Knockout-Interneuronen war die Expression von etwa 900 analysierten Genen verändert, darunter auch von Ephrinen und Ephs. Dadurch differenzierten die Interneurone nicht voll aus und die tangentielle Migration zum Cortex war gestört (van den Berghe et al., 2013). In Folge dessen wurden in Sip1-Mutanten schwere Migrationsdefekte gefunden, bei denen weniger corticale Interneurone den Neocortex erreichen und stattdessen im Striatum akkumulieren. McKinsey et al. (2013) gingen sogar so weit zu behaupten, dass corticale Interneurone in Abwesenheit von Sip1 ihren ursprünglich vorgesehenen Zelltyp ändern und sich zu einem Subtyp GABAerger, striataler Interneurone umwandeln. Diese exprimierten den typischen striatalen Marker Substanz P-Rezeptor (TacR1), sowie NPY, nNos und SST. Dabei kann die Änderung des Neuronentyps im Sip1-Knockout von cortical zu striatal sowohl durch die Änderung des Codes der Transkriptionsfaktoren, als auch durch Ortsfaktoren zustande kommen. Durch das Fehlen von Sip1 wird die Expression von Nkx2.1 nicht mehr unterdrückt. Dadurch wird in den Sip1-Knockout-Interneuronen wie in striatalen Neuronen die Expression von Neuropilinen unterbunden und die Zellen können daher in die Sema-exprimierende

striatale Anlage einwandern. Zusätzlich könnten Ortsfaktoren im Striatum dafür sorgen, dass die fehlgeleiteten Zellen die oben genannten striatalen Marker exprimieren, während gleichzeitig verschiedene Marker corticaler Interneurone herunter reguliert werden. Dabei ist es durchaus möglich, dass nur die Subpopulation von Zellen in das Striatum fehlgeleitet wird, die normalerweise Neuropiline exprimiert, während beispielsweise Ephrin-B3- oder EphA4-exprimierende Interneurone das Striatum weiterhin vermeiden. Da jedoch nur ein geringer Prozentsatz corticaler Interneurone Neuropiline exprimiert, die beobachteten Migrationsdefekte in der Sip1-Mutante jedoch vergleichsweise schwerwiegend sind, wären auch additive oder synergistische Effekte von Semaphorinen und dem Eph/Ephrin-System denkbar, die zur Vermeidung des Striatums führen. Somit kann ein Transkriptionsfaktor die Entstehung GABAerger corticaler oder striataler Interneurone bestimmen. Dabei gibt es im basalen Telencephalon jedoch über 20 Subtypen corticaler Interneurone (Xu et al., 2004, Wonders and Anderson, 2006), die alle spezifiziert und auf ihrem Weg Richtung Cortex geleitet werden müssen. Dies unterstützt eher das Modell der Zelltyp-Spezifität als das der Redundanz.

## 6. Zusammenfassung

Während der embryonalen Gehirnentwicklung wandern corticale und striatale Interneurone von ihren Ursprungsgebieten im basalen Telencephalon zu ihren weit entfernten Zielgebieten. Diese tangentielle Migration wurde vor allem für die corticalen Interneurone bereits vielfältig untersucht, wobei verschiedene Gruppen von Lenkungsfaktoren gefunden wurden, die diese Wanderung der Neurone regulieren und präzise lenken. Trotz zahlreicher Arbeiten zu diesem Thema bleiben jedoch noch immer viele Fragen unbeantwortet. Daher befasste sich die vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung der Migrationswege corticaler und striataler Interneurone aus zwei verschiedenen Ursprungsgebieten im basalen Telencephalon und ihrer Lenkung durch verschiedene Mitglieder des Eph/Ephrin-Systems.

Es konnte gezeigt werden, dass corticale Interneurone mit Ursprung in der MGE über einen dorsalen Migrationsstrom (DMS) Richtung Neocortex wandern, während solche, die in der POA geboren werden, einen ventralen Migrationsweg (VMS) nehmen. Dabei sorgt repulsives bidirektionales EphA4-/Ephrin-B3-*signaling* für eine räumliche Trennung der beiden Migrationsströme. Beide Migrationswege führen um das sich entwickelnde Striatum herum, das für die corticalen Interneurone ein Nicht-Zielgebiet darstellt. Ephrin-A3 und EphB1 zeigen eine überlappende Expression in der striatalen Anlage und kanalisieren durch ihre repulsive Wirkung auf corticale Interneurone diese Zellen auf ihrem Weg zum Cortex. Dabei wirkt Ephrin-A3 über EphA4-*forward signaling* auf die Neurone des DMS und EphB1 über Ephrin-B3-*reverse signaling* auf VMS-Neurone. Zeitgleich werden auch striatale Interneurone im basalen Telencephalon, v.a. in der POA, geboren und wandern tangential in ihr Zielgebiet, das Striatum, ein. Diese Zellen exprimieren, wie die Interneurone des VMS, ebenfalls Ephrin-B3. Diese striatale Zellpopulation wird durch die EphB1-/Ephrin-B3-Interaktion jedoch gestoppt und so in ihrem Zielgebiet gehalten. Damit löst EphB1 eine differentielle Wirkung in zwei Zellpopulationen aus, welche beide über Ephrin-B3-*reverse signaling* vermittelt werden.

Eine Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen dieser dualen Wirkung von EphB1 ergab, dass Unterschiede innerhalb der Ephrin-B3-*reverse signaling*-Signalkaskade bestehen. Dadurch werden die Level an phosphoryliertem Src und FAK in den zwei Zellpopulationen unterschiedlich reguliert. In corticalen Interneuronen führt die Bindung von EphB1 an Ephrin-B3 zur Phosphorylierung von Src und FAK, wodurch der repulsive Effekt dieses Lenkungsfaktors vermittelt wird. Im Streifenassay, bei dem die Zellen auf alternierenden Streifen aus EphB1-Fc und Kontrollprotein kultiviert wurden, zeigte sich eine deutliche EphB1-induzierte Repulsion corticaler Interneurone des VMS *in vitro*. Dieser repulsive Effekt konnte durch Zugabe eines Src- oder FAK-Inhibitors in Attraktion bzw. erhöhte Adhäsion konvertiert werden. Somit wurde in dieser Arbeit der FAK/Src-Signalkomplex als molekularer Schalter von Repulsion versus Attraktion bzw. Adhäsion im Ephrin-B3-Signaltransduktionsweg ventral migrierender corticaler Interneurone identifiziert, für die EphB1 einen Lenkungsfaktor darstellt.

Im Gegensatz dazu führt in Isl-1-positiven striatalen Zellen eine EphB1/Ephrin-B3-Bindung zu einer Reduktion des pSrc- und pFAK-Gehaltes in der Zelle, wodurch die Zellmigration zum Stillstand kommt. Dieser Zusammenhang konnte durch eine pharmakologische Reduktion der pSrc- oder pFAK-Level im Migrations- sowie im Streifenassay bestätigt werden, da die Zellen ebenfalls stoppten bzw. vermehrt auf den EphB1-Fc-Streifen zu liegen kamen. Umgekehrt wurde der bremsende Effekt von EphB1 durch künstlich erhöhte pSrc-Level aufgehoben, sodass die striatalen Neurone weitermigrierten. Somit wurde in dieser Arbeit eine neue Funktion für einen Vertreter der Eph/Ephrin-Familie gefunden, da EphB1 für diese Zellpopulation einen zuvor nicht beschriebenen Stopp-Faktor darstellt.

Um diese Befunde aus den *in vitro*-Experimenten direkt *in vivo* zu testen, wurde die Migration corticaler und striataler Interneurone in Ephrin-B3-knockout-Mäusen untersucht. In der striatalen Anlage homozygoter Ephrin-B3-knockout-Tiere wurden vermehrt fehlgeleitete Calbindin- bzw. Lhx6-positive corticale Interneurone gefunden. Dies ist konsistent mit der Hypothese, dass repulsive EphB1-/Ephrin-B3-Interaktionen das Einwandern dieser Zellen verhindern. Eine Detektion des repulsiven EphB1-Signals im Striatum war den Zellen durch das Fehlen der Ephrin-B3-Liganden im Knockout nicht mehr möglich. Darüber hinaus hatte das Ausschalten von Ephrin-B3 ebenfalls einen Einfluss auf die Verteilung Isl-1<sup>+</sup> striataler Neurone, welche eine überschießende Migration zeigten. Dieser Phänotyp stimmt also mit der Hypothese überein, dass EphB1 ein Stopp-Signal für striatale Neurone in ihrem Zielgebiet darstellt, welches durch Ephrin-B3 vermittelt wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass verschiedene Mitglieder des Eph/Ephrin-Systems eine wichtige Rolle bei der Regulation der tangentialen Migration sowohl corticaler als auch striataler Interneurone spielen. Dabei können einzelne Vertreter bifunktional wirken. Dies wurde bei der Segregation des dorsalen und ventralen Migrationsstromes corticaler Interneurone gezeigt, sowie bei der dualen Wirkung von EphB1 als Lenkungs- oder Stopp-Faktor für corticale bzw. striatale Interneurone. Diese duale Wirkung wird in Abhängigkeit von der Zellpopulation durch die unterschiedliche Regulation des FAK/Src-Signalkomplexes im Ephrin-B3- Signaltransduktionsweg vermittelt.

## 7. Summary

Neuronal migration is an important feature of brain development, since some subtypes of neurons are generated elsewhere than where they perform their later function. Cortical and striatal interneurons, for instance, are born in different regions of the basal telencephalon and then accomplish a long-range tangential migration to their destination areas. This tangential migration has already been investigated in various studies, especially for cortical interneurons. Thereby several groups of guidance factors were found that guide these migrating neurons. Despite numerous studies regarding this topic many questions remain unsolved. Hence, this study endeavored to examine the characterization of the migration paths of cortical and striatal interneurons coming from two different areas in the basal telencephalon, and their guidance by various members of the Eph/Ephrin-system.

This study demonstrated that cortical interneurons born in the MGE take a dorsal migration stream (DMS) to the Neocortex, whereas those originated in the POA migrate at a ventral path (VMS). In this process, repulsive bidirectional EphA4/Ephrin-B3 signaling mediates the segregation of both migration streams. Both pathways surround the developing striatum, which constitutes a non-target area for cortical interneurons. Ephrin-A3 and EphB1 show an overlapping expression in the striatal anlage and channel the migrating cells on their way to the cortex. In this process, Ephrin-A3 acts on neurons of the DMS via EphA4 forward signaling while EphB1 affects VMS-neurons via Ephrin-B3 reverse signaling. At the same time, striatal interneurons are also born in the basal telencephalon, mainly in the POA. They tangentially migrate to their destination area, the striatum. Just like the interneurons of the VMS, these cells also express Ephrin-B3. However, EphB1 acts as a stop signal for striatal neurons which keeps them in their target region. Thus, one single factor, EphB1, can have a different impact on two distinct cell populations which are both mediated by Ephrin-B3 reverse signaling.

An investigation of the underlying mechanisms of this dual EphB1-effect showed that there are differences within the Ephrin-B3-reverse signaling cascade. Thereby the levels of phosphorylated Src and FAK are regulated in different ways. In cortical interneurons binding of EphB1 leads to phosphorylation of Src and FAK, which mediates the repulsive effect of this guidance cue. Hence, there was a strong EphB1-induced repulsion of cortical interneurons of the VMS that were cultured on alternating stripes of EphB1-Fc and control. This repulsive effect could be converted into attraction or increased adhesion after addition of a Src- or FAK-inhibitor. Accordingly, in this paper, the FAK/Src signaling complex was identified as a molecular switch of repulsion versus attraction/adhesion in the Ephrin-B3 signaling pathway of ventrally migrating interneurons on which EphB1 acts as a guidance cue.

In contrast, in Isl-1 positive striatal neurons EphB1/Ephrin-B3 interaction reduces the intracellular pSrc and pFAK level, which leads to an arrest of cell migration. This has been confirmed by pharmacological reduction of the pSrc or pFAK level in the migration assay and the stripe assay, where the cells also stopped or were located mainly on the EphB1-Fc-containing stripes, respectively. Conversely, in the presence of an increased pSrc level, the EphB1 effect was abolished and striatal

neurons continued migration. Consequently, this study revealed a novel function for a member of the Eph/Ephrin system as a stop factor was found that had not been described for this class before.

In order to test these results of the *in vitro*-experiments directly *in vivo*, the migration of cortical and striatal interneurons was examined in Ephrin-B3 knockout mice. In the striatum of homozygous Ephrin-B3 knockout animals, a large number of misrouted cortical interneurons were found that were positive for calbindin and Lhx6. This is consistent with the hypothesis that repulsive EphB1/Ephrin-B3 interactions prevent the cells from entering the striatum. Due to the lack of Ephrin-B3 ligands in the mutant the cells could not detect the repulsive EphB1 signal of the striatum anymore. Furthermore, the knockout of Ephrin-B3 also had an impact on the distribution of Isl-1<sup>+</sup> striatal neurons, which showed an over-migration. This phenotype is concordant with the hypothesis that EphB1 acts as a stop signal for striatal neurons in their target area which is mediated by Ephrin-B3 reverse signaling.

All things considered, various members of the Eph/Ephrin system play an important role in the regulation of the tangential migration of both cortical and striatal interneurons. In this process, individual members can act bi-functional. This has been demonstrated in the segregation of the dorsal and ventral migratory stream of cortical interneurons as well as in the dual action of EphB1 as a guidance cue and a stop factor for cortical and striatal interneurons, respectively. This dual effect is mediated by the different regulation of the FAK/Src complex in the Ephrin-B3 signaling pathway depending on the cell population.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abram, C. L. and Courtneidge, S. A. (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res* 254(1): 1-13.
- Allendoerfer, K. L. and Shatz, C. J. (1994). The subplate, a transient neocortical structure: Its role in the development of connections between thalamus and cortex. *J Neurosci* 14: 185-218.
- Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67: 199-225.
- Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L. and Rubenstein, J. L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to Neocortex: dependence on Dlx genes. *Science* 278(5337): 474-476.
- Anderson, S. A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K. and Rubenstein, J. L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128(3): 353-363.
- Anderson, S. A., Qiu, M., Bulfone, A., Eisenstat, D. D., Meneses, J., Pedersen, R. and Rubenstein, J. L. (1997). Mutations of the homeobox genes Dlx-1 and Dlx-2 disrupt the striatal subventricular zone and differentiation of late born striatal neurons. *Neuron* 19(1): 27-37.
- Andrews, W. D., Barber, M. and Parnavelas, J. G. (2007). Slit-Robo interactions during cortical development. *J Anat* 211(2): 188-198.
- Ang, E. S., Jr., Haydar, T. F., Gluncic, V. and Rakic, P. (2003). Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* 23(13): 5805-5815.
- Arnaud, L., Ballif, B. A., Forster, E. and Cooper, J. A. (2003). Fyn tyrosine kinase is a critical regulator of disabled-1 during brain development. *Curr Biol* 13(1): 9-17.
- Bagri, A., Marin, O., Plump, A. S., Mak, J., Pleasure, S. J., Rubenstein, J. L. and Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33(2): 233-248.
- Barber, M., Di Meglio, T., Andrews, W. D., Hernandez-Miranda, L. R., Murakami, F., Chedotal, A. and Parnavelas, J. G. (2009). The role of Robo3 in the development of cortical interneurons. *Cereb Cortex* 19 Suppl 1: i22-31.
- Batista-Brito, R. and Fishell, G. (2009). The developmental integration of cortical interneurons into a functional network. *Curr Top Dev Biol* 87: 81-118.
- Batista-Brito, R., Machold, R., Klein, C. and Fishell, G. (2008). Gene expression in cortical interneuron precursors is prescient of their mature function. *Cereb Cortex* 18(10): 2306-2317.
- Battle, E. and Wilkinson, D. G. (2012). Molecular mechanisms of cell segregation and boundary formation in development and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(1): a008227.
- Bechara, A., Nawabi, H., Moret, F., Yaron, A., Weaver, E., Bozon, M., Abouzid, K., Guan, J. L., Tessier-Lavigne, M., Lemmon, V. and Castellani, V. (2008). FAK-MAPK-dependent adhesion disassembly downstream of L1 contributes to semaphorin3A-induced collapse. *EMBO J* 27(11): 1549-1562.
- Bellion, A., Baudoin, J. P., Alvarez, C., Bornens, M. and Metin, C. (2005). Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J Neurosci* 25(24): 5691-5699.
- Bock, H. H. and Herz, J. (2003). Reelin activates SRC family tyrosine kinases in neurons. *Curr Biol* 13(1): 18-26.
- Bonanomi, D., Chivatakarn, O., Bai, G., Abdesslem, H., Lettieri, K., Marquardt, T., Pierchala, B. A. and Pfaff, S. L. (2012). Ret is a multifunctional coreceptor that integrates diffusible- and contact-axon guidance signals. *Cell* 148(3): 568-582.
- Book, K. J. and Morest, D. K. (1990). Migration of neuroblasts by perikaryal translocation: role of cellular elongation and axonal outgrowth in the acoustic nuclei of the chick embryo medulla. *J Neurosci* 10: 55-76.



- Bortone, D. and Polleux, F. (2009). KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* 62(1): 53-71.
- Brakebusch, C. and Fassler, R. (2003). The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J* 22(10): 2324-2333.
- Brown, M. T. and Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287(2-3): 121-149.
- Bruckner, K., Pasquale, E. B. and Klein, R. (1997). Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors. *Science* 275(5306): 1640-1643.
- Brunstrom, J. E., Gray-Swain, M. R., Osborne, P. A. and Pearlman, A. L. (1997). Neuronal heterotopias in the developing cerebral cortex produced by neurotrophin-4. *Neuron* 18(3): 505-517.
- Buonanno, A. and Fischbach, G. D. (2001). Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11(3): 287-296.
- Bush, J. O. and Soriano, P. (2009). Ephrin-B1 regulates axon guidance by reverse signaling through a PDZ-dependent mechanism. *Genes Dev* 23(13): 1586-1599.
- Butt, S. J., Fuccillo, M., Nery, S., Noctor, S., Kriegstein, A., Corbin, J. G. and Fishell, G. (2005). The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48(4): 591-604.
- Carragher, N. O. and Frame, M. C. (2004). Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol* 14(5): 241-249.
- Carter, N., Nakamoto, T., Hirai, H. and Hunter, T. (2002). EphrinA1-induced cytoskeletal reorganization requires FAK and p130(cas). *Nat Cell Biol* 4(8): 565-573.
- Castellani, V., Yue, Y., Gao, P. P., Zhou, R. and Bolz, J. (1998). Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits. *J Neurosci* 18(12): 4663-4672.
- Caviness, V. S., Jr. and Sidman, R. L. (1973). Time of origin or corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol* 148(2): 141-151.
- Chacon, M. R. and Fazzari, P. (2011). FAK: dynamic integration of guidance signals at the growth cone. *Cell Adh Migr* 5(1): 52-55.
- Chai, X., Forster, E., Zhao, S., Bock, H. H. and Frotscher, M. (2009). Reelin acts as a stop signal for radially migrating neurons by inducing phosphorylation of n-cofilin at the leading edge. *Commun Integr Biol* 2(4): 375-377.
- Chen, J. H., Wen, L., Dupuis, S., Wu, J. Y. and Rao, Y. (2001). The N-terminal leucine-rich regions in Slit are sufficient to repel olfactory bulb axons and subventricular zone neurons. *J Neurosci* 21(5): 1548-1556.
- Cheng, H. J., Nakamoto, M., Bergemann, A. D. and Flanagan, J. G. (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82(3): 371-381.
- Cooke, J. E., Kemp, H. A. and Moens, C. B. (2005). EphA4 is required for cell adhesion and rhombomere-boundary formation in the zebrafish. *Curr Biol* 15(6): 536-542.
- Cooper, J. A. (2008). A mechanism for inside-out lamination in the Neocortex. *Trends Neurosci* 31(3): 113-119.
- Corbin, J. G. and Butt, S. J. (2011). Developmental mechanisms for the generation of telencephalic interneurons. *Dev Neurobiol* 71(8): 710-732.
- Courtneidge, S. A. (2003). Isolation of novel Src substrates. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1): 25-28.
- Cowan, C. A. and Henkemeyer, M. (2001). The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* 413(6852): 174-179.

- Cowan, C. W., Shao, Y. R., Sahin, M., Shamah, S. M., Lin, M. Z., Greer, P. L., Gao, S., Griffith, E. C., Brugge, J. S. and Greenberg, M. E. (2005). Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance. *Neuron* 46(2): 205-217.
- D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D. S., Sheldon, M. and Curran, T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* 24(2): 471-479.
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S.-C., Soares, H. D., Morgan, J. I. and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. 374: 719-723.
- Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z., Shamah, S. M., Hu, L., Gale, N. W. and Greenberg, M. E. (2000). EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103(6): 945-956.
- Dani, V. S., Chang, Q., Maffei, A., Turrigiano, G. G., Jaenisch, R. and Nelson, S. B. (2005). Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35): 12560-12565.
- Davis, S., Gale, N. W., Aldrich, T. H., Maisonpierre, P. C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M. and Yancopoulos, G. D. (1994). Ligands for Eph-Related Receptor Tyrosine Kinases That Require Membrane Attachment Or Clustering for Activity. 266(5186): 816-819.
- Davy, A., Gale, N. W., Murray, E. W., Klinghoffer, R. A., Soriano, P., Feuerstein, C. and Robbins, S. M. (1999). Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes & Development* 13(23): 3125-3135.
- Dawe, H. R., Minamide, L. S., Bamburg, J. R. and Cramer, L. P. (2003). ADF/cofilin controls cell polarity during fibroblast migration. *Curr Biol* 13(3): 252-257.
- de Carlos, J. A., Lopez-Mascaraque, L. and Valverde, F. (1996). Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* 16(19): 6146-6156.
- Deacon, T. W., Pakzaban, P. and Isacson, O. (1994). The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence. *Brain Res* 668(1-2): 211-219.
- Dobrzanski, P., Hunter, K., Jones-Bolin, S., Chang, H., Robinson, C., Pritchard, S., Zhao, H. and Ruggeri, B. (2004). Antiangiogenic and antitumor efficacy of EphA2 receptor antagonist. *Cancer Res* 64(3): 910-919.
- Drescher, U. (1997). The Eph family in the patterning of neural development. *Curr Biol* 7(12): R799-807.
- Drescher, U. (2011). Axon guidance: push and pull with ephrins and GDNF. *Curr Biol* 21(1): R30-32.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M. and Bonhoeffer, F. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82(3): 359-370.
- Druga, R. (2009). Neocortical inhibitory system. *Folia Biol (Praha)* 55(6): 201-217.
- Dudanova, I. and Klein, R. (2013). Integration of guidance cues: parallel signaling and crosstalk. *Trends Neurosci*.
- Dulabon, L., Olson, E. C., Taglienti, M. G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C. A., Kreidberg, J. A. and Anton, E. S. (2000). Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 27(1): 33-44.
- Egea, J. and Klein, R. (2007). Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol* 17(5): 230-238.
- Ellis, C., Kasmi, F., Ganju, P., Walls, E., Panayotou, G. and Reith, A. D. (1996). A juxtamembrane autophosphorylation site in the Eph family receptor tyrosine kinase, Sek, mediates high affinity interaction with p59fyn. *Oncogene* 12(8): 1727-1736.
- Eph Nomenclature Committee (1997). Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. *Cell* 90(3): 403-404.

- Falk, J., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, G., Grumet, M., Puschel, A. W., Sanes, J. R. and Castellani, V. (2005). Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 48(1): 63-75.
- Falls, D. L. (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284(1): 14-30.
- Faux, C., Rakic, S., Andrews, W., Yanagawa, Y., Obata, K. and Parnavelas, J. G. (2010). Differential gene expression in migrating cortical interneurons during mouse forebrain development. *J Comp Neurol* 518(8): 1232-1248.
- Feldheim, D. A., Vanderhaeghen, P., Hansen, M. J., Frisen, J., Lu, Q., Barbacid, M. and Flanagan, J. G. (1998). Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain. *Neuron* 21(6): 1303-1313.
- Fitzgerald, M., Buckley, A., Lukehurst, S. S., Dunlop, S. A., Beazley, L. D. and Rodger, J. (2008). Neurite responses to ephrin-A5 modulated by BDNF: evidence for TrkB-EphA interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 374(4): 625-630.
- Flames, N., Long, J. E., Garratt, A. N., Fischer, T. M., Gassmann, M., Birchmeier, C., Lai, C., Rubenstein, J. L. and Marin, O. (2004). Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44(2): 251-261.
- Flames, N., Pla, R., Gelman, D. M., Rubenstein, J. L., Puelles, L. and Marin, O. (2007). Delineation of multiple subpallial progenitor domains by the combinatorial expression of transcriptional codes. *J Neurosci* 27(36): 9682-9695.
- Flanagan, J. G. and Vanderhaeghen, P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21: 309-345.
- Fogarty, M., Grist, M., Gelman, D., Marin, O., Pachnis, V. and Kessaris, N. (2007). Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. *J Neurosci* 27(41): 10935-10946.
- Frame, M. C. (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 1602(2): 114-130.
- Freyd, G., Kim, S. K. and Horvitz, H. R. (1990). Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* 344(6269): 876-879.
- Frotscher, M. (1997). Dual role of Cajal-Retzius cells and reelin in cortical development. *290*: 315-322.
- Frotscher, M. (2010). Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. *Trends Neurosci* 33(9): 407-414.
- Gale, N. W., Holland, S. J., Valenzuela, D. M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T. E., Henkemeyer, M., Streibhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D. G., Pawson, T., Davis, S. and Yancopoulos, G. D. (1996). Eph receptors and Ligands Comprise Two Major Specificity Subclasses and Are Reciprocally Compartmentalized during Embryogenesis. *Neuron* 17: 9-19.
- Gao, P. P., Yue, Y., Cerretti, D. P., Dreyfus, C. and Zhou, R. (1999). Ephrin-dependent growth and pruning of hippocampal axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7): 4073-4077.
- Gao, P. P., Yue, Y., Zhang, J. H., Cerretti, D. P., Levitt, P. and Zhou, R. (1998). Regulation of thalamic neurite outgrowth by the Eph ligand ephrin-A5: implications in the development of thalamocortical projections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9): 5329-5334.
- Gelman, D., Griveau, A., Dehorter, N., Teissier, A., Varela, C., Pla, R., Pierani, A. and Marin, O. (2011). A wide diversity of cortical GABAergic interneurons derives from the embryonic preoptic area. *J Neurosci* 31(46): 16570-16580.
- Gelman, D. M. and Marin, O. (2010). Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 31(12): 2136-2141.
- Gelman, D. M., Martini, F. J., Nobrega-Pereira, S., Pierani, A., Kessaris, N. and Marin, O. (2009). The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J Neurosci* 29(29): 9380-9389.

- Gerlai, R., Shinsky, N., Shih, A., Williams, P., Winer, J., Armanini, M., Cairns, B., Winslow, J., Gao, W. and Phillips, H. S. (1999). Regulation of learning by EphA receptors: a protein targeting study. *J Neurosci* 19(21): 9538-9549.
- Ghanem, N., Yu, M., Long, J., Hatch, G., Rubenstein, J. L. and Ekker, M. (2007). Distinct cis-regulatory elements from the Dlx1/Dlx2 locus mark different progenitor cell populations in the ganglionic eminences and different subtypes of adult cortical interneurons. *J Neurosci* 27(19): 5012-5022.
- Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, G., Sidani, M., Lawrence, D. S. and Condeelis, J. S. (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* 304(5671): 743-746.
- Guellmar, A., Rudolph, J. and Bolz, J. (2009). Structural alterations of spiny stellate cells in the somatosensory cortex in ephrin-A5-deficient mice. *J Comp Neurol* 517(5): 645-654.
- Halliday, A. L. and Cepko, C. L. (1992). Generation and migration of cells in the developing striatum. *Neuron* 9(1): 15-26.
- Hamasaki, T., Goto, S., Nishikawa, S. and Ushio, Y. (2003). Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum. *Brain Res Brain Res Rev* 41(1): 1-12.
- Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A. and Connelly, P. A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271(2): 695-701.
- Hansen, M. J., Dallal, G. E. and Flanagan, J. G. (2004). Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. *Neuron* 42(5): 717-730.
- Hattori, M., Osterfield, M. and Flanagan, J. G. (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289(5483): 1360-1365.
- Henkemeyer, M., Orioli, D., Henderson, J. T., Saxton, T. M., Roder, J., Pawson, T. and Klein, R. (1996). Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *86*: 35-46.
- Hensch, T. K. and Fagiolini, M. (2005). Excitatory-inhibitory balance and critical period plasticity in developing visual cortex. *Prog Brain Res* 147: 115-124.
- Hernandez-Miranda, L. R., Parnavelas, J. G. and Chiara, F. (2010). Molecules and mechanisms involved in the generation and migration of cortical interneurons. *ASN Neuro* 2(2): e00031.
- Hevner, R. F., Daza, R. A., Englund, C., Kohtz, J. and Fink, A. (2004). Postnatal shifts of interneuron position in the Neocortex of normal and reeler mice: evidence for inward radial migration. *Neuroscience* 124(3): 605-618.
- Himanen, J. P., Chumley, M. J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W. A., Jeffrey, P. D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D. A., Boyd, A. W., Henkemeyer, M. and Nikolov, D. B. (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci* 7(5): 501-509.
- Himanen, J. P., Rajashankar, K. R., Lackmann, M., Cowan, C. A., Henkemeyer, M. and Nikolov, D. B. (2001). Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature* 414(6866): 933-938.
- Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J. and Takaku, F. (1987). A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *238*: 1717-1720.
- Hirata, T., Li, P., Lanuza, G. M., Cocas, L. A., Huntsman, M. M. and Corbin, J. G. (2009). Identification of distinct telencephalic progenitor pools for neuronal diversity in the amygdala. *Nat Neurosci* 12(2): 141-149.
- Holland, S. J., Gale, N. W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G. D., Henkemeyer, M. and Pawson, T. (1996). Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *383*: 722-725.
- Holmberg, J. and Frisen, J. (2002). Ephrins are not only unattractive. *Trends Neurosci* 25(5): 239-243.

- Holt, C. E. and Harris, W. A. (1993). Position, guidance, and mapping in the developing visual system. 24: 1400-1422.
- Honda, T., Kobayashi, K., Mikoshiba, K. and Nakajima, K. (2011). Regulation of cortical neuron migration by the Reelin signaling pathway. *Neurochem Res* 36(7): 1270-1279.
- Howell, B. W., Herrick, T. M. and Cooper, J. A. (1999). Reelin-induced tyrosine [corrected] phosphorylation of disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev* 13(6): 643-648.
- Hu, H. (1999). Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* 23(4): 703-711.
- Huynh-Do, U., Vindis, C., Liu, H., Cerretti, D. P., McGrew, J. T., Enriquez, M., Chen, J. and Daniel, T. O. (2002). Ephrin-B1 transduces signals to activate integrin-mediated migration, attachment and angiogenesis. *J Cell Sci* 115(Pt 15): 3073-3081.
- Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M. and Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377(6549): 539-544.
- Izaguirre, G., Aguirre, L., Hu, Y. P., Lee, H. Y., Schlaepfer, D. D., Aneskievich, B. J. and Haimovich, B. (2001). The cytoskeletal/non-muscle isoform of alpha-actinin is phosphorylated on its actin-binding domain by the focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 276(31): 28676-28685.
- Jacobowitz, D. M. and Abbott, L. C. (1998). *Chemoarchitectonic Atlas of the Developing Mouse Brain*. Boca Raton, Boston, London, New York, Washington D.C., CRC Press.
- Janes, P. W., Nievergall, E. and Lackmann, M. (2012). Concepts and consequences of Eph receptor clustering. *Semin Cell Dev Biol* 23(1): 43-50.
- Janis, L. S., Cassidy, R. M. and Kromer, L. F. (1999). Ephrin-A binding and EphA receptor expression delineate the matrix compartment of the striatum. *J Neurosci* 19(12): 4962-4971.
- Jossin, Y., Bar, I., Ignatova, N., Tissir, F., De Rouvroit, C. L. and Goffinet, A. M. (2003). The reelin signaling pathway: some recent developments. *Cereb Cortex* 13(6): 627-633.
- Jovceva, E., Larsen, M. R., Waterfield, M. D., Baum, B. and Timms, J. F. (2007). Dynamic cofilin phosphorylation in the control of lamellipodial actin homeostasis. *J Cell Sci* 120(Pt 11): 1888-1897.
- Kakita, A. and Goldman, J. E. (1999). Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. *Neuron* 23(3): 461-472.
- Kakita, A. and Goldman, J. E. (1999). Patterns and dynamics of SVZ cell migration in the postnatal forebrain: monitoring living progenitors in slice preparations. 23(3): 461-472.
- Kappeler, C., Saillour, Y., Baudoin, J. P., Tuy, F. P., Alvarez, C., Houbron, C., Gaspar, P., Hamard, G., Chelly, J., Metin, C. and Francis, F. (2006). Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum Mol Genet* 15(9): 1387-1400.
- Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H. and Edlund, T. (1990). Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344(6269): 879-882.
- Katakowski, M., Zhang, Z., deCarvalho, A. C. and Chopp, M. (2005). EphB2 induces proliferation and promotes a neuronal fate in adult subventricular neural precursor cells. *Neurosci Lett* 385(3): 204-209.
- Kiuchi, T., Ohashi, K., Kurita, S. and Mizuno, K. (2007). Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. *J Cell Biol* 177(3): 465-476.
- Klausberger, T. and Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321(5885): 53-57.
- Klein, R. (2004). Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 16(5): 580-589.
- Klein, R. (2009). Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling. *Nat Neurosci* 12(1): 15-20.

- Klein, R. (2012). Eph/ephrin signalling during development. *Development* 139(22): 4105-4109.
- Klinghoffer, R. A., Sachsenmaier, C., Cooper, J. A. and Soriano, P. (1999). Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J* 18(9): 2459-2471.
- Knoll, B. and Drescher, U. (2002). Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci* 25(3): 145-149.
- Knoll, B. and Drescher, U. (2004). Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J Neurosci* 24(28): 6248-6257.
- Kullander, K., Croll, S. D., Zimmer, M., Pan, L., McClain, J., Hughes, V., Zabski, S., DeChiara, T. M., Klein, R., Yancopoulos, G. D. and Gale, N. W. (2001). Ephrin-B3 is the midline barrier that prevents corticospinal tract axons from recrossing, allowing for unilateral motor control. *Genes Dev* 15(7): 877-888.
- Kullander, K. and Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(7): 475-486.
- Labrador, J. P., Brambilla, R. and Klein, R. (1997). The N-terminal globular domain of Eph receptors is sufficient for ligand binding and receptor signaling. *Embo Journal* 16: 3889-3897.
- Lackmann, M., Mann, R. J., Kravets, L., Smith, F. M., Bucci, T. A., Maxwell, K. F., Howlett, G. J., Olsson, J. E., Vanden Bos, T., Cerretti, D. P. and Boyd, A. W. (1997). Ligand for EPH-related kinase (LERK) 7 is the preferred high affinity ligand for the HEK receptor. *J Biol Chem* 272(26): 16521-16530.
- Lackmann, M., Oates, A. C., Dottori, M., Smith, F. M., Do, C., Power, M., Kravets, L. and Boyd, A. W. (1998). Distinct subdomains of the EphA3 receptor mediate ligand binding and receptor dimerization. *J Biol Chem* 273(32): 20228-20237.
- Lakatosova, S. and Ostatnikova, D. (2012). Reelin and its complex involvement in brain development and function. *Int J Biochem Cell Biol* 44(9): 1501-1504.
- Lambert de Rouvroit, C. and Goffinet, A. M. (1998). The reeler mouse as a model of brain development. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 150: 1-106.
- Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V. and Parnavelas, J. G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 19(18): 7881-7888.
- Lawrenson, I. D., Wimmer-Kleikamp, S. H., Lock, P., Schoenwaelder, S. M., Down, M., Boyd, A. W., Alewood, P. F. and Lackmann, M. (2002). Ephrin-A5 induces rounding, blebbing and de-adhesion of EphA3-expressing 293T and melanoma cells by Crkl and Rho-mediated signalling. *J Cell Sci* 115(Pt 5): 1059-1072.
- Le, T. N., Du, G., Fonseca, M., Zhou, Q. P., Wigle, J. T. and Eisenstat, D. D. (2007). Dlx homeobox genes promote cortical interneuron migration from the basal forebrain by direct repression of the semaphorin receptor neuropilin-2. *J Biol Chem* 282(26): 19071-19081.
- Lee, S., Hjerling-Leffler, J., Zagha, E., Fishell, G. and Rudy, B. (2010). The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci* 30(50): 16796-16808.
- Levitt, P. (2005). Developmental neurobiology and clinical disorders: lost in translation? *Neuron* 46(3): 407-412.
- Lewis, D. A., Hashimoto, T. and Volk, D. W. (2005). Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6(4): 312-324.
- Li, J., Liu, N., Wang, Y., Wang, R., Guo, D. and Zhang, C. (2012). Inhibition of EphA4 signaling after ischemia-reperfusion reduces apoptosis of CA1 pyramidal neurons. *Neurosci Lett* 518(2): 92-95.
- Liebl, D. J., Morris, C. J., Henkemeyer, M. and Parada, L. F. (2003). mRNA expression of ephrins and Eph receptor tyrosine kinases in the neonatal and adult mouse central nervous system. *J Neurosci Res* 71(1): 7-22.
- Lim, B. K., Matsuda, N. and Poo, M. M. (2008). Ephrin-B reverse signaling promotes structural and functional synaptic maturation in vivo. *Nat Neurosci* 11(2): 160-169.

- Liodis, P., Denaxa, M., Grigoriou, M., Akufo-Addo, C., Yanagawa, Y. and Pachnis, V. (2007). Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 27(12): 3078-3089.
- Lopez-Bendito, G., Sturgess, K., Erdelyi, F., Szabo, G., Molnar, Z. and Paulsen, O. (2004). Preferential origin and layer destination of GAD65-GFP cortical interneurons. *Cereb Cortex* 14(10): 1122-1133.
- Lu, B., Su, Y., Das, S., Wang, H., Wang, Y., Liu, J. and Ren, D. (2009). Peptide neurotransmitters activate a cation channel complex of NALCN and UNC-80. *Nature* 457(7230): 741-744.
- Makinen, T., Adams, R. H., Bailey, J., Lu, Q., Ziemiecki, A., Alitalo, K., Klein, R. and Wilkinson, G. A. (2005). PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes Dev* 19(3): 397-410.
- Malatesta, P., Hartfuss, E. and Gotz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127(24): 5253-5263.
- Mann, F., Peuckert, C., Dehner, F., Zhou, R. and Bolz, J. (2002). Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development* 129(16): 3945-3955.
- Marillat, V., Cases, O., Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C. and Chedotal, A. (2002). Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol* 442(2): 130-155.
- Marin, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 13(2): 107-120.
- Marin, O., Anderson, S. A. and Rubenstein, J. L. (2000). Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J Neurosci* 20(16): 6063-6076.
- Marin, O. and Rubenstein, J. L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2(11): 780-790.
- Marin, O. and Rubenstein, J. L. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26: 441-483.
- Marin, O., Valiente, M., Ge, X. and Tsai, L. H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2): a001834.
- Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M. and Rubenstein, J. L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293(5531): 872-875.
- Marler, K. J., Becker-Barroso, E., Martinez, A., Llovera, M., Wentzel, C., Poopalasundaram, S., Hindges, R., Soriano, E., Comella, J. and Drescher, U. (2008). A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *J Neurosci* 28(48): 12700-12712.
- Marston, D. J., Dickinson, S. and Nobes, C. D. (2003). Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol* 5(10): 879-888.
- Martinez, A. and Soriano, E. (2005). Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Brain Res Rev* 49(2): 211-226.
- Martini, F. J., Valiente, M., Lopez Bendito, G., Szabo, G., Moya, F., Valdeolmillos, M. and Marin, O. (2009). Biased selection of leading process branches mediates chemotaxis during tangential neuronal migration. *Development* 136(1): 41-50.
- McConnell, S. K. (1988). Development and decision-making in the mammalian cerebral cortex. *Brain Res* 472(1): 1-23.
- McKinsey, G. L., Lindtner, S., Trzcinski, B., Visel, A., Pennacchio, L. A., Huylebroeck, D., Higashi, Y. and Rubenstein, J. L. (2013). Dlx1&2-dependent expression of Zfhx1b (Sip1, Zeb2) regulates the fate switch between cortical and striatal interneurons. *Neuron* 77(1): 83-98.
- Mellitzer, G., Xu, Q. and Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 400(6739): 77-81.
- Metin, C., Baudoin, J. P., Rakic, S. and Parnavelas, J. G. (2006). Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 23(4): 894-900.



- Mission, J. P., Takahashi, T. and Caviness, V. S., Jr. (1991). Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia* 4(2): 138-148.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A. and Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1): 56-68.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. and Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31(5): 727-741.
- Miyoshi, G., Butt, S. J., Takebayashi, H. and Fishell, G. (2007). Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci* 27(29): 7786-7798.
- Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., Sousa, V. H., Butt, S. J., Battiste, J., Johnson, J. E., Machold, R. P. and Fishell, G. (2010). Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J Neurosci* 30(5): 1582-1594.
- Moen, I., Jevne, C., Wang, J., Kalland, K. H., Chekenya, M., Akslen, L. A., Sleire, L., Enger, P. O., Reed, R. K., Oyan, A. M. and Stuhr, L. E. (2012). Gene expression in tumor cells and stroma in dsRed 4T1 tumors in eGFP-expressing mice with and without enhanced oxygenation. *BMC Cancer* 12: 21.
- Monschau, B., Kremoser, C., Ohta, K., Tanaka, H., Kaneko, T., Yamada, T., Handwerker, C., Hornberger, M. R., Loschinger, J., Pasquale, E. B., Siever, D. A., Verderame, M. F., Muller, B. K., Bonhoeffer, F. and Drescher, U. (1997). Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *EMBO J* 16(6): 1258-1267.
- Moriyama, K., Iida, K. and Yahara, I. (1996). Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1(1): 73-86.
- Mountcastle, V. B. (1997). The columnar organization of the Neocortex. *Brain* 120 ( Pt 4): 701-722.
- Mühlfriedel, S. (1999). Die Bedeutung von ephrin-A5 für die Entwicklung thalamocorticaler Projektionen. Jena, Friedrich-Schiller-Universität.
- Myers, J. P. and Gomez, T. M. (2011). Focal adhesion kinase promotes integrin adhesion dynamics necessary for chemotropic turning of nerve growth cones. *J Neurosci* 31(38): 13585-13595.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O. and Pearlman, A. L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4(2): 143-150.
- Nadarajah, B. and Parnavelas, J. G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3(6): 423-432.
- Nagaoka, R., Abe, H. and Obinata, T. (1996). Site-directed mutagenesis of the phosphorylation site of cofilin: its role in cofilin-actin interaction and cytoplasmic localization. *Cell Motil Cytoskeleton* 35(3): 200-209.
- Nakajima, K. (2007). Control of tangential/non-radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Neurochem Int* 51(2-4): 121-131.
- Nery, S., Fishell, G. and Corbin, J. G. (2002). The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci* 5(12): 1279-1287.
- Nguyen Ba-Charvet, K. T., Brose, K., Marillat, V., Kidd, T., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C. and Chedotal, A. (1999). Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 22(3): 463-473.
- Nicol, X., Muzerelle, A., Rio, J. P., Metin, C. and Gaspar, P. (2006). Requirement of adenylate cyclase 1 for the ephrin-A5-dependent retraction of exuberant retinal axons. *J Neurosci* 26(3): 862-872.
- Nicol, X., Voyatzis, S., Muzerelle, A., Narboux-Neme, N., Sudhof, T. C., Miles, R. and Gaspar, P. (2007). cAMP oscillations and retinal activity are permissive for ephrin signaling during the establishment of the retinotopic map. *Nat Neurosci* 10(3): 340-347.
- Niehage, R., Peukert, C., Bolz, J. and Weth, F. (2005). Developmental expression of Ephrin/Eph wiring molecules in mouse homologs of schizophrenia-related brain regions. *SfN 35th Annual Meeting*, Washington.

- Nobrega-Pereira, S., Kessaris, N., Du, T., Kimura, S., Anderson, S. A. and Marin, O. (2008). Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* 59(5): 733-745.
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. and Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7(2): 136-144.
- O'Leary, D. D. and Wilkinson, D. G. (1999). Eph receptors and ephrins in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 9(1): 65-73.
- Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H. and Mikoshiba, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* 14(5): 899-912.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T. and Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407(3): 313-319.
- Olivier, C., Cobos, I., Perez Villegas, E. M., Spassky, N., Zalc, B., Martinez, S. and Thomas, J. L. (2001). Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development* 128(10): 1757-1769.
- Olsson, M., Bjerregaard, K., Winkler, C., Gates, M., Bjorklund, A. and Campbell, K. (1998). Incorporation of mouse neural progenitors transplanted into the rat embryonic forebrain is developmentally regulated and dependent on regional and adhesive properties. *Eur J Neurosci* 10(1): 71-85.
- Olsson, M., Campbell, K., Victorin, K. and Bjorklund, A. (1995). Projection neurons in fetal striatal transplants are predominantly derived from the lateral ganglionic eminence. *Neuroscience* 69(4): 1169-1182.
- Owens, D. F. and Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3(9): 715-727.
- Palmer, A., Zimmer, M., Erdmann, K. S., Eulenburg, V., Porthin, A., Heumann, R., Deutsch, U. and Klein, R. (2002). EphrinB phosphorylation and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell* 9(4): 725-737.
- Park, E., Kim, Y., Noh, H., Lee, H., Yoo, S. and Park, S. (2013). EphA/ephrin-A signaling is critically involved in region-specific apoptosis during early brain development. *Cell Death Differ* 20(1): 169-180.
- Parsons, C. J., Takashima, M. and Rippe, R. A. (2007). Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 22 Suppl 1: S79-84.
- Pasquale, E. B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(6): 462-475.
- Pasquale, E. B. (2008). Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133(1): 38-52.
- Passante, L., Gaspard, N., Degraeve, M., Frisen, J., Kullander, K., De Maertelaer, V. and Vanderhaeghen, P. (2008). Temporal regulation of ephrin/Eph signalling is required for the spatial patterning of the mammalian striatum. *Development* 135(19): 3281-3290.
- Pauly, M. C., Piroth, T., Dobrossy, M. and Nikkhah, G. (2012). Restoration of the striatal circuitry: from developmental aspects toward clinical applications. *Front Cell Neurosci* 6: 16.
- Pawlak, G. and Helfman, D. M. (2002). MEK mediates v-Src-induced disruption of the actin cytoskeleton via inactivation of the Rho-ROCK-LIM kinase pathway. *J Biol Chem* 277(30): 26927-26933.
- Pawson, T. and Bernstein, A. (1990). Receptor tyrosine kinases: genetic evidence for their role in *Drosophila* and mouse development. *Trends Genet* 6(11): 350-356.
- Peuckert, C., Wacker, E., Rapus, J., Levitt, P. and Bolz, J. (2008). Adaptive changes in gene expression patterns in the somatosensory cortex after deletion of ephrinA5. *Mol Cell Neurosci* 39(1): 21-31.

- Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112(4): 453-465.
- Polleux, F., Whitford, K. L., Dijkhuizen, P. A., Vitalis, T. and Ghosh, A. (2002). Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* 129(13): 3147-3160.
- Prestoz, L., Chatzopoulou, E., Lemkine, G., Spassky, N., Lebras, B., Kagawa, T., Ikenaka, K., Zalc, B. and Thomas, J. L. (2004). Control of axonophilic migration of oligodendrocyte precursor cells by Eph-ephrin interaction. *Neuron Glia Biol* 1(1): 73-83.
- Rakic, P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *J Comp Neurol* 141(3): 283-312.
- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey Neocortex. 145: 61-84.
- Rakic, P. (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183(4123): 425-427.
- Rakic, P. (1995). Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 11323-11327.
- Ricard, J., Salinas, J., Garcia, L. and Liebl, D. J. (2006). EphrinB3 regulates cell proliferation and survival in adult neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 31(4): 713-722.
- Rodger, J., Goto, H., Cui, Q., Chen, P. B. and Harvey, A. R. (2005). cAMP regulates axon outgrowth and guidance during optic nerve regeneration in goldfish. *Mol Cell Neurosci* 30(3): 452-464.
- Rodger, J., Salvatore, L. and Migani, P. (2012). Should I stay or should I go? Ephs and ephrins in neuronal migration. *Neurosignals* 20(3): 190-201.
- Rubenstein, J. L. and Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2(5): 255-267.
- Rubin, A. N., Alfonsi, F., Humphreys, M. P., Choi, C. K., Rocha, S. F. and Kessaris, N. (2010). The germinal zones of the basal ganglia but not the septum generate GABAergic interneurons for the cortex. *J Neurosci* 30(36): 12050-12062.
- Rudolph, J., Zimmer, G., Steinecke, A., Barchmann, S. and Bolz, J. (2010). Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon. *Cell Adh Migr* 4(3): 400-408.
- Saeger, B. M., Suhm, M. and Neubuser, A. (2011). Ephrin/ephrin receptor expression during early stages of mouse inner ear development. *Dev Dyn* 240(6): 1578-1585.
- Sahin, M., Greer, P. L., Lin, M. Z., Poucher, H., Eberhart, J., Schmidt, S., Wright, T. M., Shamah, S. M., O'Connell, S., Cowan, C. W., Hu, L., Goldberg, J. L., Debant, A., Corfas, G., Krull, C. E. and Greenberg, M. E. (2005). Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron* 46(2): 191-204.
- Sanada, K., Gupta, A. and Tsai, L. H. (2004). Disabled-1-regulated adhesion of migrating neurons to radial glial fiber contributes to neuronal positioning during early corticogenesis. *Neuron* 42(2): 197-211.
- Santiago, A. and Erickson, C. A. (2002). Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration. *Development* 129(15): 3621-3632.
- Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C. L., Wilkinson, G. A., Pitulescu, M. E., Acker, T. and Acker-Palmer, A. (2010). Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* 465(7297): 487-491.
- Schiffmann, S. N., Bernier, B. and Goffinet, A. M. (1997). Reelin mRNA expression during mouse brain development. *Eur J Neurosci* 9(5): 1055-1071.
- Scita, G. and Di Fiore, P. P. (2010). The endocytic matrix. *Nature* 463(7280): 464-473.
- Sentürk, A., Pfennig, S., Weiss, A., Burk, K. and Acker-Palmer, A. (2011). Ephrin Bs are essential components of the Reelin pathway to regulate neuronal migration. *Nature* 472(7343): 356-360.

- Shamah, S. M., Lin, M. Z., Goldberg, J. L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R. L., Corfas, G., Debant, A. and Greenberg, M. E. (2001). EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105(2): 233-244.
- Simon, M. A. (2000). Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell* 103(1): 13-15.
- Solanas, G., Cortina, C., Sevillano, M. and Batlle, E. (2011). Cleavage of E-cadherin by ADAM10 mediates epithelial cell sorting downstream of EphB signalling. *Nat Cell Biol* 13(9): 1100-1107.
- Song, J., Vranken, W., Xu, P., Gingras, R., Noyce, R. S., Yu, Z., Shen, S. H. and Ni, F. (2002). Solution structure and backbone dynamics of the functional cytoplasmic subdomain of human ephrin B2, a cell-surface ligand with bidirectional signaling properties. *Biochemistry* 41(36): 10942-10949.
- Stein, E., Lane, A. A., Cerretti, D. P., Schoecklmann, H. O., Schroff, A. D., Van Etten, R. L. and Daniel, T. O. (1998). Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev* 12(5): 667-678.
- Steinecke, A., Zimmer, G., Gampe, C., Rudolph, J., and Bolz, J. (2013). EphA/ephrin-A Reverse Signaling Promotes the Migration of MGE-derived Cortical Interneurons. *Development, under revision*.
- Suetterlin, P., Marler, K. M. and Drescher, U. (2012). Axonal ephrinA/EphA interactions, and the emergence of order in topographic projections. *Semin Cell Dev Biol* 23(1): 1-6.
- Sussel, L., Marin, O., Kimura, S. and Rubenstein, J. L. (1999). Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126(15): 3359-3370.
- Tamamaki, N., Fujimori, K. E. and Takauji, R. (1997). Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J Neurosci* 17(21): 8313-8323.
- Tanaka, M., Kamo, T., Ota, S. and Sugimura, H. (2003). Association of Dishevelled with Eph tyrosine kinase receptor and ephrin mediates cell repulsion. *EMBO J* 22(4): 847-858.
- Tepper, J. M., Tecuapetla, F., Koos, T. and Ibanez-Sandoval, O. (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat* 4: 150.
- Tissir, F. and Goffinet, A. M. (2003). Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* 4(6): 496-505.
- Torii, M., Hashimoto-Torii, K., Levitt, P. and Rakic, P. (2009). Integration of neuronal clones in the radial cortical columns by EphA and ephrin-A signalling. *Nature* 461(7263): 524-528.
- Torres, R., Firestein, B. L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E. N., Huganir, R. L., Bredt, D. S., Gale, N. W. and Yancopoulos, G. D. (1998). PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. *Neuron* 21(6): 1453-1463.
- Uziel, D., Muhlfriedel, S., Zarbalis, K., Wurst, W., Levitt, P. and Bolz, J. (2002). Miswiring of limbic thalamocortical projections in the absence of ephrin-A5. *J Neurosci* 22(21): 9352-9357.
- van den Berghe, V., Stappers, E., Vandesande, B., Dimidschstein, J., Kroes, R., Francis, A., Conidi, A., Lesage, F., Dries, R., Cazzola, S., Berx, G., Kessaris, N., Vanderhaeghen, P., van Ijcken, W., Grosveld, F. G., Goossens, S., Haigh, J. J., Fishell, G., Goffinet, A., Aerts, S., Huylebroeck, D. and Seuntjens, E. (2013). Directed migration of cortical interneurons depends on the cell-autonomous action of Sip1. *Neuron* 77(1): 70-82.
- van der Geer, P., Hunter, T. and Lindberg, R. A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10: 251-337.
- Vanderhaeghen, P., Lu, Q., Prakash, N., Frisen, J., Walsh, C. A., Frostig, R. D. and Flanagan, J. G. (2000). A mapping label required for normal scale of body representation in the cortex. *Nat Neurosci* 3(4): 358-365.
- Vielmetter, J., Stolze, B., Bonhoeffer, F. and Stuermer, C. A. (1990). In vitro assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells. *Exp Brain Res* 81(2): 283-287.
- Vitriol, E. A. and Zheng, J. Q. (2012). Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. *Neuron* 73(6): 1068-1081.

- Vucurovic, K., Gallopin, T., Ferezou, I., Rancillac, A., Chameau, P., van Hooft, J. A., Geoffroy, H., Monyer, H., Rossier, J. and Vitalis, T. (2010). Serotonin 3A receptor subtype as an early and protracted marker of cortical interneuron subpopulations. *Cereb Cortex* 20(10): 2333-2347.
- Wang, H. F. and Liu, F. C. (2001). Developmental restriction of the LIM homeodomain transcription factor *Islet-1* expression to cholinergic neurons in the rat striatum. *Neuroscience* 103(4): 999-1016.
- Wang, X. J., Tegner, J., Constantinidis, C. and Goldman-Rakic, P. S. (2004). Division of labor among distinct subtypes of inhibitory neurons in a cortical microcircuit of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5): 1368-1373.
- Wang, Y., Nakayama, M., Pitulescu, M. E., Schmidt, T. S., Bochenek, M. L., Sakakibara, A., Adams, S., Davy, A., Deutsch, U., Luthi, U., Barberis, A., Benjamin, L. E., Makinen, T., Nobes, C. D. and Adams, R. H. (2010). Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 465(7297): 483-486.
- Ward, M. E., Jiang, H. and Rao, Y. (2005). Regulated formation and selection of neuronal processes underlie directional guidance of neuronal migration. *Mol Cell Neurosci* 30(3): 378-387.
- Way, J. C. and Chalfie, M. (1988). *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell* 54(1): 5-16.
- Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T. and Horwitz, A. F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6(2): 154-161.
- Weinl, C., Drescher, U., Lang, S., Bonhoeffer, F. and Loschinger, J. (2003). On the turning of *Xenopus* retinal axons induced by ephrin-A5. *Development* 130(8): 1635-1643.
- Whitford, K. L., Marillat, V., Stein, E., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Chedotal, A. and Ghosh, A. (2002). Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron* 33(1): 47-61.
- Whittington, M. A. and Traub, R. D. (2003). Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci* 26(12): 676-682.
- Wichterle, H., Alvarez-Dolado, M., Erskine, L. and Alvarez-Buylla, A. (2003). Permissive corridor and diffusible gradients direct medial ganglionic eminence cell migration to the Neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(2): 727-732.
- Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J. M., Herrera, D. G. and Alvarez-Buylla, A. (1999). Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain. *Nat Neurosci* 2(5): 461-466.
- Wichterle, H., Turnbull, D. H., Nery, S., Fishell, G. and Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* 128(19): 3759-3771.
- Wilby, M. J., Muir, E. M., Fok-Seang, J., Gour, B. J., Blaschuk, O. W. and Fawcett, J. W. (1999). N-Cadherin inhibits Schwann cell migration on astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 14(1): 66-84.
- Wilkinson, D. G. (2000). Topographic mapping: organising by repulsion and competition? *Curr Biol* 10(12): R447-451.
- Wimmer-Kleikamp, S. H., Janes, P. W., Squire, A., Bastiaens, P. I. and Lackmann, M. (2004). Recruitment of Eph receptors into signaling clusters does not require ephrin contact. *J Cell Biol* 164(5): 661-666.
- Wonders, C. P. and Anderson, S. A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* 7(9): 687-696.
- Wonders, C. P., Taylor, L., Welagen, J., Mbata, I. C., Xiang, J. Z. and Anderson, S. A. (2008). A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence. *Dev Biol* 314(1): 127-136.
- Wu, L., Bernard-Trifilo, J. A., Lim, Y., Lim, S. T., Mitra, S. K., Uryu, S., Chen, M., Pallen, C. J., Cheung, N. K., Mikolon, D., Mielgo, A., Stupack, D. G. and Schlaepfer, D. D. (2008). Distinct FAK-Src activation events promote  $\alpha 5 \beta 1$  and  $\alpha 4 \beta 1$  integrin-stimulated neuroblastoma cell motility. *Oncogene* 27(10): 1439-1448.

- Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J. Y. and Rao, Y. (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400(6742): 331-336.
- Wybenga-Groot, L. E., Baskin, B., Ong, S. H., Tong, J., Pawson, T. and Sicheri, F. (2001). Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell* 106(6): 745-757.
- Xu, N. J. and Henkemeyer, M. (2012). Ephrin reverse signaling in axon guidance and synaptogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 23(1): 58-64.
- Xu, Q., Cobos, I., De La Cruz, E., Rubenstein, J. L. and Anderson, S. A. (2004). Origins of cortical interneuron subtypes. *J Neurosci* 24(11): 2612-2622.
- Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V. and Wilkinson, D. G. (1999). In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature* 399(6733): 267-271.
- Yau, H. J., Wang, H. F., Lai, C. and Liu, F. C. (2003). Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus: preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cereb Cortex* 13(3): 252-264.
- Yuan, W., Zhou, L., Chen, J. H., Wu, J. Y., Rao, Y. and Ornitz, D. M. (1999). The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance. *Dev Biol* 212(2): 290-306.
- Yun, M. E., Johnson, R. R., Antic, A. and Donoghue, M. J. (2003). EphA family gene expression in the developing mouse Neocortex: Regional patterns reveal intrinsic programs and extrinsic influence. *Journal of Comparative Neurology* 456(3): 203-216.
- Zagrebelsky, M., Holz, A., Dechant, G., Barde, Y. A., Bonhoeffer, T. and Korte, M. (2005). The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J Neurosci* 25(43): 9989-9999.
- Zhao, S. and Frotscher, M. (2010). Go or stop? Divergent roles of Reelin in radial neuronal migration. *Neuroscientist* 16(4): 421-434.
- Zhou, N., Zhao, W. D., Liu, D. X., Liang, Y., Fang, W. G., Li, B. and Chen, Y. H. (2011). Inactivation of EphA2 promotes tight junction formation and impairs angiogenesis in brain endothelial cells. *Microvasc Res* 82(2): 113-121.
- Zhu, Y., Li, H., Zhou, L., Wu, J. Y. and Rao, Y. (1999). Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the Neocortex. *Neuron* 23(3): 473-485.
- Zimmer, G. (2007a). Die Rolle von EphrinA5 bei der Aggregation und Migration corticaler Neurone während der Entwicklung des Telencephalons. Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Zimmer, G., Garcez, P., Rudolph, J., Niehage, R., Weth, F., Lent, R. and Bolz, J. (2008). Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons. *Eur J Neurosci* 28(1): 62-73.
- Zimmer, G., Kastner, B., Weth, F. and Bolz, J. (2007). Multiple effects of ephrin-A5 on cortical neurons are mediated by SRC family kinases. *J Neurosci* 27(21): 5643-5653.
- Zimmer, G., Rudolph, J., Landmann, J., Gerstmann, K., Steinecke, A., Gampe, C. and Bolz, J. (2011). Bidirectional EphrinB3/EphA4 Signaling Mediates the Segregation of Medial Ganglionic Eminence- and Preoptic Area-Derived Interneurons in the Deep and Superficial Migratory Stream. *J Neurosci* 31(50): 18364-18380.
- Zimmer, G., Schanuel, S. M., Burger, S., Weth, F., Steinecke, A., Bolz, J. and Lent, R. (2010). Chondroitin sulfate acts in concert with semaphorin 3A to guide tangential migration of cortical interneurons in the ventral telencephalon. *Cereb Cortex* 20(10): 2411-2422.
- Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J. and Klein, R. (2003). EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol* 5(10): 869-878.
- Zisch, A. H., Kalo, M. S., Chong, L. D. and Pasquale, E. B. (1998). Complex formation between EphB2 and Src requires phosphorylation of tyrosine 611 in the EphB2 juxtamembrane region. *Oncogene* 16(20): 2657-2670.

## 9. Anhang

### 9.1. Puffer und Lösungen

Für in-vitro-Experimente wurden ausschließlich sterile Lösungen verwendet. Selbst angesetzte Lösungen, oder Lösungen, deren Sterilität nicht vom Hersteller garantiert war, wurden daher entweder sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) oder für 20 min bei 212 °C und 2 bar autoklaviert. Falls nicht anders angegeben wurde bidestilliertes Wasser (Aqua bidest) als Lösemittel verwendet.

#### 9.1.1. Puffer

**PBS** (Phosphate Buffered Saline):

8 g/l NaCl  
0,2 g/l KCl  
0,2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (wasserfrei)  
1,15 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (wasserfrei)  
pH 7,4; autoklaviert, Lagerung bei 4 °C

**GBSS** (Gey's Balanced Salt Solution):

1,53 mM  $\text{CaCl}_2$   
3,66 mM KCl  
0,22 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
1,03 mM  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$   
0,28 mM  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$   
138 mM NaCl  
2,7 mM  $\text{NaHCO}_3$   
0,84 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
5,56 mM Glukose  
pH 7,4; sterilfiltriert; Lagerung bei 4 °C

**Krebspuffer:**

126 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
1,2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
1,2 mM  $\text{MgCl}_2$   
2,1 mM  $\text{CaCl}_2$   
10 mM Glukose  
12,5 mM  $\text{NaHCO}_3$   
pH 7,4; sterilfiltriert; Lagerung bei 4 °C

**postholding-Puffer für Vibratomschnitte:**

10 mM HEPES  
1 % Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml)  
0,2 % Gentamicin  
in Krebspuffer  
Lagerung bei 4 °C

**STEN-Puffer:** 150 mM NaCl  
50 mM TRIS  
2 mM EDTA  
0,2 % Triton-X-100  
Lagerung bei 4 °C

**TBS-T-Puffer:** 300 mM NaCl  
10 mM TRIS  
0,1 % Tween20  
pH 7,6; Lagerung bei 4 °C

### 9.1.2. Lösungen für die Zell- und Gewebekultur

**65 %ige Glukose Stammlösung:** 32,5 g D-(+)-Glukose in 50 ml Aqua bidest  
sterilfiltriert; Lagerung bei -20 °C

**GBSS/Glukose:** 0,65 % Glukose in GBSS  
frisch vor Gebrauch angesetzt

**HBSS/Glukose:** 0,65 % Glukose in HBSS ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>  
frisch vor Gebrauch angesetzt

**2,5 % Trypsin:** 25 %iges Trypsin 1:10 in sterilem PBS  
Lagerung bei -20 °C

**Beschichtungslösung für Deckgläschen:** 19,5 µg/ml Laminin  
5 µg/ml Poly-L-Lysin  
in GBSS  
frisch vor Gebrauch angesetzt

**Kulturmedium für primäre neuronale Einzelzellen:** 10 % hitzeinaktiviertes FBS  
1 % Penicillin (10,000 U/ml)/Streptomycin (10,000 µg/ml)  
1 % L-Glutamin  
0,15 % Glukose-Stammlösung  
in DMEM  
Lagerung für max. 7 Tage bei 4 °C



<b>Kulturmedium für coronale Schnitte:</b>	30 % HBSS 10 % hitzeinaktiviertes FBS 1 % Penicillin (10,000 U/ml)/Streptomycin (10,000 µg/ml) 1 % Glukose-Stammlösung In DMEM/F12 Lagerung für max. 7 Tage bei 4 °C
<b>Kulturmedium für primäre neuronale Explantate:</b>	0,4 g Methylzellulose unter Rühren bei 4 °C in 95 ml DMEM gelöst 5 % hitzeinaktiviertes FBS 1 % Penicillin (10,000 U/ml)/Streptomycin (10,000 µg/ml) 1 % L-Glutamin 0,15 % Glukose-Stammlösung sterilfiltriert; Lagerung für max. 7 Tage bei 4 °C
<b>Kulturmedium für NIH/3T3-Fibroblasten:</b>	10 % hitzeinaktiviertes FBS 1 % Penicillin (10,000 U/ml)/Streptomycin (10,000 µg/ml) 0,4 % Geneticin G418 in DMEM/F12 Lagerung für max. 7 Tage bei 4 °C
<b>Chloralhydrat:</b>	10 % Chloralhydrat in PBS Lagerung bei Raumtemperatur
<b>Thrombin:</b>	10.000 U Thrombin in 7,94 ml sterilem Aqua bidest gelöst; 30 min bei 2500 U/min zentrifugieren Lagerung bei -20 °C vor Gebrauch wurden 30 µl Thrombin frisch mit 1 ml GBSS versetzt

### 9.1.3. Lösungen für die Immunhistochemie

<b>Fixierlösung:</b>	4 % PFA in PBS bei 60 °C gelöst pH 7,4; Lagerung bei -20 °C
<b>Sucroslösung:</b>	10 % bzw. 30 % Sucrose (m/v) in PBS Lagerung bei 4 °C

<b>Waschpuffer:</b>	0,2 % Triton-X-100 in PBS Lagerung bei 4 °C
<b>Blockierungsreagenz:</b>	3 % BSA 10 % Ziegennormalserum 0,2 % Triton-X-100 in PBS Lagerung bei 4 °C
<b>DAPI-Stammlösung:</b>	1 mg/ml DAPI in Aqua bidest Lagerung bei 4 °C
<b>Einbettmedium Mowiol:</b>	25 % Mowiol (m/v) 50 % Glycerin (v/v) 17,5 % n-Propyl-Gallat (m/v) 2 % Timerosal in PBS Lagerung bei -20 °C
<b>9.1.4. sonstige Lösungen</b>	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub>:</b>	1 ml/l DEPC in Aqua bidest autoklaviert, Lagerung bei RT
<b>PBS<sub>DT</sub>:</b>	1 ml/l DEPC in PBS pH 7,4; autoklaviert, Lagerung bei RT
<b>TEA:</b>	15 g/l TEA 3,6 ml/l HCl in H <sub>2</sub> O <sub>DT</sub> pH 8,0; autoklaviert, Lagerung bei RT
<b>Hybridisierungslösung:</b>	50 % Formamid 25 % 5x SSC 0,4 µg/µl Torula RNA 0,1 µg/µl tRNA 3 ng/µl Sonde 5x Denhardt's Reagenz

**SSC 20x:** 175 g/l NaCl  
88 g/l Trinatriumcitrat  
in H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub>  
pH 7,0; autoklaviert, Lagerung bei RT

## 9.2. weitere Materialien

### 9.2.1. rekombinante Proteine

Tabelle 1: Verwendete rekombinante Proteine

Protein	Hersteller
Ephrin-A3-Fc	R&D Systems
Ephrin-B3-Fc	R&D Systems
EphA4-Fc	R&D Systems
EphA6-Fc	R&D Systems
EphB1-Fc	R&D Systems
IgG Isotyp-Kontrolle (Fc-Protein)	Rockland Inc.

### 9.2.2. Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

IHC – Immunhistochemie, ICC – Immunzytochemie, ISH – *in situ* Hybridisierung, WB – Westernblot

Primärantikörper	Hersteller	Zweck	Verdünnung	Inkubationszeit und -temperatur
mouse anti-Actin	Santa Cruz	WB	1:1000	ÜN, 4 °C
rabbit anti-Calbindin	Swant	IHC	1:1000	ÜN, 4 °C
rabbit anti-EphA4	Santa Cruz	ICC	1:800	1 h, RT
mouse anti-Islet-1	developmental studies hybridoma bank	ICC	1:200	ÜN, 4 °C
		IHC	1:200	ÜN, RT
rabbit anti-FAK	Millipore	WB	1:1000	ÜN, RT
rabbit anti-Lhx6	Santa Cruz	IHC	1:100	ÜN, RT
rabbit anti-pFAK (pY397)	Invitrogen	ICC	1:500	ÜN, 4 °C
		WB	1:500	ÜN, RT
rabbit anti-pSrc (pY418)	Biosource	ICC	1:250	ÜN, 4 °C
rabbit anti-pTyr (pY350)	Santa Cruz	ICC	1:500	ÜN, 4 °C
<b>Sekundärantikörper</b>				
Alkalische Phosphatase-konjugiertes anti-DIG Fab-Fragment	Roche	ISH	1:750	2-3 h, RT
goat anti-mouse Alexa633	Invitrogen	ICC	1:500	1,5 h, RT
Biotin-konjugiert goat anti-mouse	Sigma	WB	1:400	1 h, RT
Biotin-konjugiert goat anti-rabbit	Vector	WB	1:400	1 h, RT

goat anti-rabbit Cy2	Jackson ImmunoResearch	ICC	1:100-1:300	1,5 h, RT
goat anti-rabbit Cy3	Jackson ImmunoResearch	ICC IHC	1:2000 1:2000	1,5 h, RT 2 h, RT
goat anti-mouse Cy3	Jackson ImmunoResearch	ICC IHC	1:2000 1:2000	1,5 h, RT 2 h, RT

### 9.2.3. siRNAs

Tabelle 3: Verwendete siRNAs

siRNA	Hersteller
Alexa555-labeled RNA duplex (BLOCK-iT Alexa Fluor red fluorescent oligo)	Invitrogen
Ephrin-B3 siRNA	Santa Cruz
EphA4 siRNA	Santa Cruz

### 9.2.4. RNA-Sonden

Die für die *in situ*-Hybridisierung verwendeten Digoxigenin-markierten RNA-Sonden wurden freundlicherweise von Diplom-Biologin Sandra Barchmann zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4: Verwendete RNA-Sonden

Sonde	Position	GenBank accession number	Hybridisierungstemperatur
Ephrin-A3	290-1156	NM_010108	68 °C
Ephrin-B3	137-955	NM_007911	56 °C
EphA4	75-761	NM_007936	68 °C
EphB1	609-1480	NM_173447	56 °C

### 9.2.5. Primer

Die für die Amplifikation von Ephrin-B3-cDNA verwendeten Primer wurden von Diplom-Biologin Katrin Gerstmann zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5: Verwendete Primer

Primer	Sequenz
Ephrin-B3	forward: GGGATATGGAAGCTTTGAGAC reverse: GGTATCACCACCCACAACCAGC
Aktin	forward: AGAGGGAAATCGTGCG reverse: CAATAGTGATGACCTGGCCGT

## 9.2.6. Chemikalien

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acetanhydrid	Sigma
Agarose low melt	ROTH
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)	Roche
Blockierungsreagenz für in situ Hybridisierung	Roche
BSA (Bovine serum albumin)	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Sigma
Cell Tracker Green C2925 (5-chloromethyl-fluoresceindiacetat)	Molecular Probes
Chloralhydrat	Sigma
DAB-Kit	Vector Laboratories
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma
Denhardt's Reagenz	Eppendorf
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
Dichlormethan	ROTH
DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium)	GIBCO by Life Technologies
DMEM/F12	Sigma
EDTA	Sigma
Epitope Retrieval Solution	Leica
Ethanol	ROTH
FAK-Inhibitor	Santa Cruz
FBS (fötales Kälberserum)	GIBCO by Life Technologies
Formamid	Sigma
Geneticin G418	Sigma
Gentamicin	GIBCO by Life Technologies
D-Glukose	Sigma
L-Glutamin	GIBCO by Life Technologies
Glycerin	Sigma
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	GIBCO by Life Technologies
HEPES	ROTH
KCl	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
Laminin	Sigma
Lipofectamine2000	Invitrogen
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen
Methylzellulose	Sigma
MgCl <sub>2</sub>	MERCK

MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	MERCK
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	MERCK
Mowiol	Calbiochem
NaCl	Sigma
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma
NaOH	Sigma
NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)	Roche
OptiMEM	GIBCO by Life Technologies
Penicillin-Streptomycin	GIBCO by Life Technologies
PFA (Paraformaldehyd)	MERCK
Plasma vom Huhn	Sigma
PhosSTOP Phosphatase-Inhibitoren	Roche
Poly-L-Lysin	Sigma
PP2 (4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-( <i>t</i> -butyl) pyrazolo[3,4-d]pyrimidin)	Calbiochem
PP3 (4-Amino-7-phenylpyrazolo[3,4-d]pyrimidin)	Calbiochem
n-Propyl-Gallat	Sigma
RevertAid MinusM-MuLV Reverse Transcriptase	Fermentas
RNase away	Molecular Bio Products
Src-Familie Aktivator	Santa Cruz
Sucrose	Sigma
TEA (Triethanolamin)	Sigma
Thrombin	Sigma
Timerosal	Sigma
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma
Trinatriumcitrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	ROTH
Triton-X-100	Sigma
Trizol	ROTH
Trypsin 10x	Sigma
Tween20	MERCK
Wolframkugeln	BIO RAD
Ziegennormalserum	GIBCO by Life Technologies

### 9.2.7. Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
2-Photonen Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510	ZEISS
Axiovert S-100 inverses Mikroskop	ZEISS
Gewebehacker „Tissue Chopper“	The Mickle Laboratory Engineering
Hot-Bead-Sterilisator	Fine Science Tools
Inkubator „HERA cell“	Heraeus Instruments
Kryostat	Leica
Laminarbox „HERA safe“	Heraeus Instruments
SPOT Kamera	Visitron Systems
Stereomikroskop „Stemi 2000“	ZEISS
Vibrating Microtome 500-202	TSE-Systems
Zentrifuge „Biofuge Stratos“	Heraeus Instruments

### 9.2.8. weitere Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Weitere verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
4-12 % Bis-Tris-Gele	Invitrogen
6-Well-Schalen	Nunc
Deckgläser	MENZEL-Gläser
Maschennetz	SCHÜTT
Nitrozellulosemembran	Amersham
Nucleopore Polycarbonatmembran	Whatman
Objektträger	MENZEL-Gläser
Objektträger Superfrost Ultra Plus	MENZEL-Gläser
Petrischalen (Durchmesser 10 cm und 6 cm)	Nunc
Silikon Streifen-Matrize	Max-Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen
Sterilfilter	SARTORIUS

### 9.3. Zusatzmaterial

Die beiliegende CD enthält alle Abbildungen dieser Arbeit noch einmal in digitaler Form.

## 9.4. Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb	Abbildung
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bidest	bidestilliertes Wasser
cDNA	komplementäre DNA
CGE	caudale ganglionische Eminenz
Ctx	Cortex
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DIV	days in vitro
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMS	dorsaler Migrationsstrom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonaltag
ECM	extrazelluläre Matrix
efn	Ephrin
FAK	<i>focal adhesion kinase</i> /fokale Adhäsionskinase
FBS	fötales Kälberserum
GABA	γ-Aminobuttersäure
GBSS	Gey's balanced salt solution
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
H	Hippocampus
HBSS	Hank's balanced salt solution
Ig	Immunglobulin
IMZ	Intermediärzone
Isl-1	Isl-1
LGE	laterale ganglionische Eminenz
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
M	Molar
MGE	mediale ganglionische Eminenz
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA/Boten-RNA
MZ	Marginalzone
n	Stichprobenumfang
n.s.	nicht signifikant
NCtx	Neocortex
p	phospho-
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCTX	pirformer Cortex
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
POA	präoptisches Areal
PP2	4-Amino-5-(4-Chlorophenyl)-7-(t-Butyl)pyrazolo[3,4-d]Pyrimidin
PP3	4-Amino-7-Phenylpyrazolo[3,4-d]Pyrimidin
PV	Parvalbumin
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SFK	Src-Familie-Kinase
siRNA	small interfering RNA
SST	Somatostatin
Str	striatale Anlage/Striatum
SVZ	Subventrikularzone
Tab	Tabelle
Tyr	Tyrosin
U	Units
ÜN	über Nacht
ÜZ	Übergangszone
VMS	ventraler Migrationsstrom
VZ	Ventrikularzone



## 9.5. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jürgen Bolz, der mir die Möglichkeit gab, die vorliegende Arbeit in seinem Institut und seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Darüber hinaus bedanke ich mich für seine fachliche Betreuung und die hilfreichen Diskussionen während verschiedener Stadien des Projektes und bei der Zusammenstellung dieser Arbeit. Mein Dank gilt auch seinem Einsatz für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit, durch die mir auch die Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen ermöglicht wurde, welche wegweisend für die Entwicklung meines Projektes waren.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Dr. Geraldine Zimmer, die mir maßgeblich bei der Entwicklung des Themas geholfen und mir als Diskussionspartnerin immer wieder neue Impulse für mein Projekt gegeben hat. Durch unsere lange freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor und ihr offenes Ohr für alle Arten von Problemen wurden wir zu mehr als nur Kollegen, was mir stets Kraft und Motivation für meine Arbeit gab. Dr. Annika Döding möchte ich für die angenehme gemeinsame Zeit im Büro danken, sowie für ihre unermüdliche Bereitschaft, diverse Probleme meiner Ergebnisse zu diskutieren. Katrin Gerstmann gilt mein Dank für die Durchführung der *in situ*-Hybridisierungen im ephrin-B-System, ebenso wie für ihre freundliche und oft selbstverständliche Hilfsbereitschaft während unserer gemeinsamen Laborzeit, die mir so manches erleichtert hat. Danke auch für viele schöne private Abende. Sandra Barchmann danke ich für die Durchführung der *in situ*-Hybridisierungen im ephrin-A-System. Bei André Steinecke möchte ich mich für viele gemeinsame Präparier-Stunden und hilfreiche Diskussionen und Anregungen für meine Arbeit bedanken. Marcel Isstas danke ich für treue Kaffeekoch-Dienste – Pausen sind oft wichtig und konstruktiv. Auch allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Institutes für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie sei an dieser Stelle gedankt – die Arbeit am Institut hat mir stets große Freude bereitet.

Ein großer Dank geht auch an Frau Raue, deren sorgfältige technische Assistenz mir eine große Hilfe war. Außerdem möchte ich unserer Sekretärin Frau Behr für die stets freundliche Unterstützung danken, ob in persönlichen oder in Labor-Angelegenheiten, wie beispielsweise dem Bestellwesen der Arbeitsgruppe.

Prof. Dr. Rüdiger Klein danke ich für die Bereitstellung der Ephrin-B3-knockout-Mauslinie.

Einen Dank auch an meine Freunde, die mich während dieser Zeit begleitet und unterstützt haben. Vor allem möchte ich an dieser Stelle Claudia Kühne für ihre Massagekünste danken, die mir lange Stunden vor dem Computer erleichtert haben, sowie Katja Nebelung für ihre langjährige Freundschaft, die mir immer wieder Kraft gab.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern und meinen Geschwistern, auf deren Hilfe ich immer zählen konnte und die mich immer wieder aufgebaut und unterstützt haben. Danke!

## 9.6. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Judith Rudolph

Geboren am 11.08.1982 in Jena

### Promotion

seit 2007                      wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena mit dem Ziel einer Promotion

### Akademische Ausbildung:

2001-2007                      Studium der Diplom-Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Hauptfach: Zoologie  
Nebenfächer: Anthropologie/Humanbiologie und Medizinische Mikrobiologie

2006-2007                      Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Thema: „Untersuchungen zur Morphologie von Schicht-5-Pyramidenzellen im somatosensorischen Cortex von EphrinA5-knockout-Mäusen“

07/2007                         Diplom (Durchschnitt 1,2)

### Schulausbildung:

1993-2001                      Adolf-Reichwein-Gymnasium Jena; Abitur (Durchschnitt 1,5)

1991-1993                      Grundschule Westschule Jena

1989-1991                      Zehnklassige allgemeinbildende polytechnische Oberschule Jena

## 9.7. Publikationsliste

### begutachtete Publikationen

Differential effects of EphB1 on cortical and striatal neurons.

Rudolph J, Gerstmann K, Zimmer G, Steinecke A, Döding A, Bolz J

Publikation in Vorbereitung

EphA/Ephrin-A Reverse Signaling Promotes the Migration of MGE-derived Cortical Interneurons.

Steinecke A, Zimmer G, Gampe C, Rudolph J, Bolz J. (2013)

Development, under revision.

Bidirectional EphrinB3/EphA4 Signaling Mediates the Segregation of Medial Ganglionic Eminence- and Preoptic Area-Derived Interneurons in the Deep and Superficial Migratory Stream.

Zimmer G, Rudolph J, Landmann J, Gerstmann K, Steinecke A, Gampe C, Bolz J. (2011)

J Neurosci;31(50):18364-80.

Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon.

Rudolph J, Zimmer G, Steinecke A, Barchmann S, Bolz J. (2010)

Cell Adh Migr; 4(3):400-8. Epub 2010

Structural alterations of spiny stellate cells in the somatosensory cortex in Ephrin-A5-deficient mice.

Guellmar A, Rudolph J, Bolz J. (2009)

J Comp Neurol; 517(5):645-54.

Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons.

Zimmer G, Garcez P, Rudolph J, Niehage R, Weth F, Bolz J. (2008)

Eur J Neurosci; 28(1):62-73.

### nicht begutachtete Veröffentlichungen

Differential effects of EphB1 on cortical and striatal neurons.

Rudolph J, Gerstmann K, Zimmer G, Steinecke A, Bolz J.

Program No. 72.28; 8<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience, Barcelona 2012

Reisestipendium der German Neuroscience Society (NWG)

Ephrin-B3 reverse signaling regulates the tangential migration of cortical interneurons in the basal telencephalon.

Rudolph J, Steinecke A, Zimmer G and Bolz J

Program No. T1-9A; 9<sup>th</sup> Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, 2011

Ephrin-B3 reverse signaling in the basal telencephalon during interneuron migration.

Rudolph J, Steinecke A, Zimmer G and Bolz J

Program No. 130.13/B3; 40<sup>th</sup> annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 2010

Reisestipendium ProChance 2010

A dual role of EphA4 signaling in the basal telencephalon during interneuron migration.

Steinecke A, Rudolph J, Zimmer G and Bolz J

Program No. 130.12/B2; 40<sup>th</sup> annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 2010

B-Ephrins regulate the tangential migration of cortical interneurons.

Rudolph J, Steinecke A, Zimmer G and Bolz J

Program No. 219.2/A23; 39<sup>th</sup> annual Meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, 2009

Reisestipendium ProChance 2009

EphA4-induced reverse signaling acts as a motogen for GABAergic interneurons.

Steinecke A, Rudolph J, Zimmer G and Bolz J

Program No. 219.1/A22; 39<sup>th</sup> annual Meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, 2009

Morphology of spiny stellate cells in Ephrin-A5 deficient mice.

Guellmar A, Rudolph J and Bolz J

7<sup>th</sup> Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, 2007

### **9.8. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Es wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Insofern Dritte an einzelnen Experimenten beteiligt waren, wurde dies kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde weder als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung, noch an einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ist mir bekannt.

Jena, den 07.05.2013

Judith Rudolph